

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-507912

(P2005-507912A)

(43) 公表日 平成17年3月24日 (2005.3.24)

(51) Int. Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
C 07 C 43/23		C 07 C 43/23	C	4 C 08 6	
A 6 1 K 31/198		C 07 C 43/23	D	4 C 2 0 6	
A 6 1 K 31/255		C 07 C 43/23	E	4 H 0 0 6	
A 6 1 K 31/661		A 6 1 K 31/198		4 H 0 5 0	
A 6 1 K 31/6615		A 6 1 K 31/255			
		審査請求	未請求	予備審査請求	有 (全 108 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2003-537577 (P2003-537577)	(71) 出願人	503224792		
(86) (22) 出願日	平成14年10月28日 (2002.10.28)	オキシジーン、 インコーポレイテッド			
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月26日 (2004.4.26)	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02			
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/034497	472, ウォータータウン, アーセナ			
(87) 国際公開番号	W02003/035008	ル ストリート 321			
(87) 国際公開日	平成15年5月1日 (2003.5.1)	(71) 出願人	504164310		
(31) 優先権主張番号	60/337,348	バイロー ユニバーシティ			
(32) 優先日	平成13年10月26日 (2001.10.26)	アメリカ合衆国 テキサス 76798-			
(33) 優先権主張国	米国 (US)	7034, ワコ, ビー. オー. ボックス 97034			
		(74) 代理人	100078282		
		弁理士 山本 秀策			
		(74) 代理人	100062409		
		弁理士 安村 高明			
		最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 改良型血管標的化剤としての官能化スチレン誘導体

(57) 【要約】

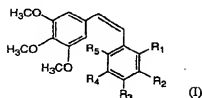
本発明は、新規スチレンノイド化合物およびそれらのプロドラッグ形態が開示されており、これらは、固形腫瘍および不必要な新血管形成に関連した他の疾患を処置するのに有用な強力な血管標的化剤として働く。これらの新規スチレンノイド化合物は、コンプレクスタチンA-1およびコンプレクスタチンA-4に構造的に関連したチューブリン結合スチレンノイド類似物である。これらのプロドラッグ形態は、固形腫瘍および網膜の新血管形成に伴う疾患の処置に有用な強力な血管標的化剤 (V T A s) として働く。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次式の化合物：

【化 1】



10

ここで：

R_1 、 R_4 および R_5 は、別個に、 H 、 OH 、低級アルコキシ、 NH_2 、 NO_2 、 N_3 、 $NH-R_6$ 、ハロゲン、一般式 $(-O-P(O)(O^-M^+))_2$ のリン酸エステル塩部分または $-OPO_3$ 、 R_7 、 R_8 であって、ここで、 M は、金属カチオンまたは塩（例えば、 Na 、 K および Li ）である；

R_2 は、 H 、 OH 、低級アルコキシ、 NH_2 、 NO_2 、 $NH-R_6$ 、または一般式 $(-O-P(O)(O^-M^+))_2$ のリン酸エステル塩部分、または $-OPO_3$ 、 R_7 、 R_8 であって、ここで、 M は、金属カチオンまたは塩（例えば、 Na 、 K および Li ）であり、ここで、 NH_2 または OH は、 R_1 と環化し得る；

R_3 は、 H 、低級アルコキシ、または一般式 $(-O-P(O)(O^-M^+))_2$ のリン酸エステル塩部分、または $-OPO_3$ 、 R_7 、 R_8 であって、ここで、 M は、金属カチオンまたは塩（例えば、 Na 、 K および Li ）である；

R_6 は、アミノ酸アシルアミノ基である；そして

R_7 および R_8 は、別個に、低級アルキル、シクロアルキル、アリールまたはアンモニウム塩 (NH_4^+) である、

化合物。

【請求項 2】

R_1 、 R_4 および R_5 が、別個に、 H 、 OH または NHR_6 であり、

R_2 が、 H 、アミノ酸アシルアミノ基、または一般式 $(-O-P(O)(O^-M^+))_2$ のリン酸エステル塩部分、または $-OPO_3$ 、 R_7 、 R_8 であって、ここで、 M は、金属カチオンまたは塩（例えば、 Na 、 K および Li ）であり、

R_3 が、低級アルコキシであり、そして

R_6 が、アミノ酸アシルアミノ基である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

前記アミノ酸アシルアミノ基が、セリンアミドである、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

チューブリン含有系と有効量の請求項 1 に記載の化合物とを接触することにより、チューブリンの重合を阻害する方法。

【請求項 5】

前記系が、腫瘍細胞である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

新生物疾患に冒されたホストに有効量の請求項 1 に記載の化合物を投与することにより、該ホストを処置する方法。

【請求項 7】

前記接触した系が、患者内に位置している、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記患者が、哺乳動物である、請求項 7 に記載の方法。

50

【請求項 9】

請求項 1 に記載の化合物を投与することにより癌を処置する方法であって、ここで、処置する該癌は、白血病、肺癌、大腸癌、甲状腺癌、CNS、黒色腫、卵巣癌、腎臓癌、前立腺癌および乳癌を含む、方法。

【請求項 10】

活性成分としての請求項 1 に記載の化合物および薬学的に受容可能な担体を含有する、製薬組成物。

【請求項 11】

有効量の請求項 10 に記載の製薬組成物を該製薬組成物が必要な患者に投与することにより、腫瘍血管系を選択的に標的化し破壊する方法。

10

【請求項 12】

有効量の請求項 10 に記載の製薬組成物を該製薬組成物が必要な患者に投与することにより、腫瘍への血液流れを選択的に少なくする方法。

【請求項 13】

有効量の請求項 10 に記載の製薬組成物を該製薬組成物が必要な患者に投与することにより、黄斑変性症、糖尿病性網膜症、および血管新生が関与した目の関連疾患を処置する方法。

【請求項 14】

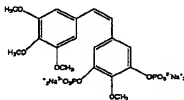
有効量の請求項 10 に記載の製薬組成物を該製薬組成物が必要な患者に投与することにより、再狭窄を処置する方法。

20

【請求項 15】

次式の化合物：

【化 2】



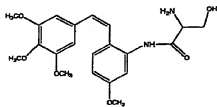
30

。

【請求項 16】

次式の化合物：

【化 3】



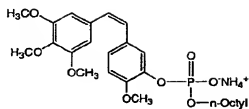
40

。

【請求項 17】

次式の化合物：

【化 4】

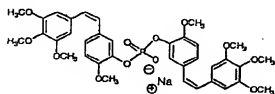


10

。【請求項 18】

次式の化合物：

【化 5】

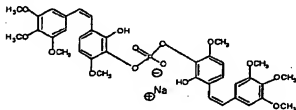


20

。【請求項 19】

次式の化合物：

【化 6】

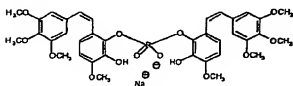


30

。【請求項 20】

次式の化合物：

【化 7】

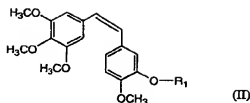


40

。【請求項 21】

次式の化合物：

【化 8】



ここで：

R_1 は、一般式 $(-O-P(O)(O^-M^+)_2)$ のリン酸エステル塩部分、 $-OPO_3R_2$ またはスルホン酸アルキルであって、ここで、 M は、金属カチオンまたは塩（例えば、 Na 、 K および Li ）である；

R_2 は、アルキル基またはアンモニウム塩 (NH_4^+) である；そして

R_3 は、アルキル基、アリール基またはシクロアルキルである、化合物。

【請求項 22】

R_1 が、一般式 $-PO_3R_2R_3$ のリン酸エステル塩部分であり、

R_2 は、アンモニウム塩 (NH_4^+) であり、そして

R_3 は、アルキル基である、請求項 21 に記載の化合物。

【請求項 23】

チューブリン含有系と有効量の請求項 21 に記載の化合物とを接触することにより、チューブリンの重合を阻害する方法。

【請求項 24】

前記系が、腫瘍細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

新生物疾患に冒されたホストに請求項 22 に記載の化合物を投与することにより、該ホストを処置する方法。

【請求項 26】

前記接触した系が、患者内に位置している、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 27】

前記患者が、哺乳動物である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

請求項 21 に記載の化合物を該化合物が必要な患者に投与することにより癌を処置する方法であって、ここで、処置する該癌は、白血病、肺癌、大腸癌、甲状腺癌、CNS、黒色腫、卵巣癌、腎臓癌、前立腺癌および乳癌を含む、方法。

【請求項 29】

活性成分としての請求項 21 に記載の化合物および薬学的に受容可能な担体を含有する、製薬組成物。

【請求項 30】

有効量の請求項 29 に記載の製薬組成物を該化合物が必要な患者に投与することにより、腫瘍血管系を選択的に標的化し破壊する方法。

【請求項 31】

有効量の請求項 29 に記載の製薬組成物を該化合物が必要な患者に投与することにより、腫瘍への血液流れを選択的に少なくする方法。

【請求項 32】

有効量の請求項 29 に記載の製薬組成物を該化合物が必要な患者に投与することにより、黄斑変性症、糖尿病性網膜症、および血管新生が関与した目の関連疾患を処置する方法。

【請求項 33】

有効量の請求項 29 に記載の製薬組成物を該化合物が必要な患者に投与することにより、

再狭窄を処置する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、新規スチルベノイド化合物およびそれらのプロドラッグ形態に関し、これらは、固形腫瘍癌および不必要な新血管形成に関連した他の疾患を処置するのに有用な強力な血管標的化剤として働く。

【0002】

さらに特定すると、本発明は、コンプレタスタチンA-1およびコンプレタスタチンA-104に構造的に関連したチューブリン結合スチルベノイド類似物に関する。

【背景技術】

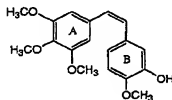
【0003】

(発明の背景)

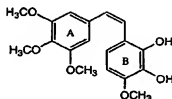
南アフリカのヤナギの木 (*Combretum caffrum*) に由来のコンプレタスタチンと総称して知られている天然生成物が発見されたことで、チューブリンのアセンブリが微小管に入るのを阻害する有糸分裂阻害剤の開発において、新たな世紀が始まった。コンプレタスタチンA-4 (CA-4) およびコンプレタスタチンA-1 (CA-1) は、以下の構造を有し、これらは、ヒトの癌細胞系に対するインビトロ細胞毒性の点で、また、チューブリンのアセンブリが β -チューブリン上のコルヒチン結合部位での直接的な相互作用によって微小管に入るのを阻害する性能の点で、特に強力である：

【0004】

【化9】



CA-4



CA-1

。【0005】

CA-4 および CA-1 の両方は、チューブリンアセンブリの強力な阻害剤であり、ヒトの癌細胞系に対する細胞毒性が高い (表1) のに対して、これらの両方のインビトロアッセイでは、CA-4 は CA-1 よりも生体活性が高いことが示唆されることは、興味深く、注目に値する。

【0006】

表1: コンプレタスタチンおよびコンプレタスタチンプロドラッグのインビトロ評価

【0007】

【表1】

	チューブリン重合 の阻害 (IC ₅₀)	1 時間での MTT 細胞毒性 (IC ₅₀)	5 時間での MTT 細胞毒性 (IC ₅₀)
CA-4	1-2 uM	0.1uM	0.05 uM
CA-1	2-4 uM	10uM	0.05 uM
CA-4P	>40uM	0.8uM	0.002 uM
CA-1P	>40uM	3.2uM	0.0046 uM

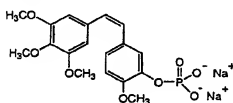
。

【00008】

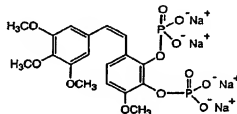
しかしながら、これらの類似物の両方は、それらの対応するプロドラッグ形態（従って、CA-4 P および CA-1 P）に変換され、腫瘍血管停止（図 1）および腫瘍成長遅延（図 2）に点で、インビボで評価され、次いで、SCID マウスにおいて、CA-1 P が CA-4 P よりも 8 ~ 10 倍も活性が高いことが明らかである。CA 4 P および CA 1 P は、以下の構造を有する：

【00009】

【化 10】



CA-4P



CA-1P

。

【00010】

CA-1 P の場合、殆どの有望な生体作用形態は、最終的に、CA-1 P（これは、チューブリンと活性ではない）を親 CA-1（これは、チューブリンと活性である）に変換する非特異的アルカリホスファターゼ（または関連酵素）により、酵素開裂されると思われる。CA-1 は、細胞骨格チューブリンのアセンブリが微小管に入るのを阻害し、その結果、腫瘍の微小血管を裏打ちする内皮細胞に形態学的な変化を引き起こす。この形態学的な変化により、内皮細胞は、「丸くなって」、その結果、この微小血管が血流を維持できなくなる。血液凝固および他の事象が続いて起こり、これは、最終的に、それを取り囲む腫瘍組織の死を引き起こす。健康な細胞は、大抵の場合、この化合物が全身投与されても、影響を受けない。この選択性には、いくつかの可能性が存在し、これには、以下が挙げられる（これらに限定されない）：（a）腫瘍の微小血管を裏打ちする内皮細胞の環境での非特異的アルカリホスファターゼの高い活性または発現が存在する可能性；（b）腫瘍微小血管での健康な成熟細胞と急速に増殖している未熟内皮細胞との間のチューブリンそれ自体の潜在的な差であって、これは、腫瘍の微小環境におけるチューブリン組立/分解プロセスの大きな崩壊を引き起こす；（c）腫瘍細胞は、「漏出性」血管を有することが知られており、腫瘍成長遅延の改善の一部は、それらの血管を離れて腫瘍の周りの細胞質ゾル（この場所では、それは、「供給プール」を形成でき、これは、最終的に、腫瘍細胞それ自体に入り、（親化合物として）、細胞系の分裂中期の間に、細胞分裂を阻害する有糸分裂阻害剤として機能する）に入る化合物が原因である可能性がある。CA-1 P の向上したインビボ活性（10 倍）は、一部には、そのホスフェート基の両方の開裂（多分、一方が他方よりも急速に開裂する）およびチューブリンでの親ジフェノール（または多

10

20

30

40

50

分、モノフェノール／モノホスフェートの一方または両方)の引き続いた相互作用に関連した薬物動態が原因であり得る。

【0011】

従って、本発明に至る研究の目的は、CA-1Pの高い活性が全体的に2, 3-ニリン酸塩のB環にある置換基パターンを原因とし得るのではなく、むしろ、2-スチルベノイド化合物に関連した薬物動態の変化が原因であり得ることを立証し確認することにある、この化合物は、C-2'、C-5' またはC-6' で追加基 (これは、電子バイアスまたは立体バイアスのいずれかを備えている) と共に、3, 4, 5-トリメトキシフェニルモチーフをA環および4'-メトキシ、3'-O-ホスフェートに取り込む。この基本的な構造パターンを有する化合物は、良好な生体利用能および好ましい薬物動態を示し、その結果、チューブリンとVTAsとしての改良された効能との相互作用が改善される。本明細書中で記述した新規化合物は、そのA環でトリメトキシアリール置換パターンを有するものの、C-2、C-3、C-4、C-5およびC-6位置でのメトキシ基の一部を変えることが論理的な伸展であることは、当業者に容易に明らかとなるはずである。この種の置換パターンはまた、VTAsとしての化合物活性を生じ得る。

【0012】

A環での3, 4, 5-トリメトキシ置換パターンおよびB環での4'-メトキシ部分が、これらのスチルベノイド類似物にとって、ファルマコフォアの重要な構造上の特徴であることは、種々の研究から示唆されている (図3)。従って、本発明者は、新規分子の殆どにてこれらの官能基を維持し、B環の周りにて、さらに別の置換パターンを含めた。本発明およびその一部をなす化合物は、しかしながら、この点には限定されず、B環の4'-メトキシ部分以外による置換は、考慮される。(CA-4Pと関連して) CA-1Pの改良されたインビボ活性は、単に、ジホスフェート部分の存在が原因ではなく、むしろ、この化合物の薬物動態と強力な関係を有し得ることは、本発明者の論点であり、これには、そのホスフェート基の酵素的開裂 (おそらく、非特異的アルカリホスファターゼによる)、チューブリンアセンブリの引き続いた阻害が挙げられ、その結果、腫瘍の微小血管を裏打ちする未熟内皮細胞の形態学的な変化 (丸くなる) が起こり、これらの微小血管が血流を維持できなくなる。追加薬物動態パラメータ (例えば、チューブリン結合の可逆性、および多分、腫瘍細胞それ自体の周りにある細胞質ゾル液への親CA-1の取り込み) もまた、重要な生物学的な役割を果たし得る。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0013】

(発明の要旨)

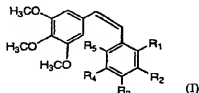
本発明は、新規スチルベン化合物に関し、さらに特定すると、チューブリン結合スチルベノイド類似物 (これらは、コンプレクスタチンA-1およびA-4に構造的に関連している) に関する。これらの新規化合物の合成は、それらのインビトロおよびインビボ活性を証明する実験と共に、本明細書中にて開示されている。

【0014】

第一局面では、本発明は、以下の構造で表わされる新規スチルベン化合物を提供する：

【0015】

【化11】



ここで：

R_1 、 R_4 および R_5 は、別個に、 H 、 OH 、低級アルコキシ、 NH_2 、 NO_2 、 N_3 、 $NH-R_6$ 、ハロゲン、一般式 $(-O-P(O)(O^-M^+)_2)$ のリン酸エステル塩部分または $-OPO_3R_7R_8$ であって、ここで、 M は、金属カチオンまたは塩（例えば、 Na 、 K および Li ）である；

R_2 は、 H 、 OH 、低級アルコキシ、 NH_2 、 NO_2 、 $NH-R_6$ 、または一般式 $(-O-P(O)(O^-M^+)_2)$ のリン酸エステル塩部分、または $-OPO_3R_7R_8$ であって、ここで、 M は、金属カチオンまたは塩（例えば、 Na 、 K および Li ）であり、ここで、 NH_2 または OH は、 R_1 と環化し得る；

R_3 は、 H 、低級アルコキシ、または一般式 $(-O-P(O)(O^-M^+)_2)$ のリン酸エステル塩部分、または $-OPO_3R_7R_8$ であって、ここで、 M は、金属カチオンまたは塩（例えば、 Na 、 K および Li ）である；

R_6 は、アミノ酸シルアミノ基である；そして

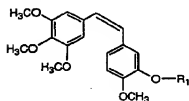
R_7 および R_8 は、別個に、低級アルキル、シクロアルキル、アリールまたはアンモニウム塩 (NH_4^+) である。

【0016】

第二局面では、本発明は、以下の構造で表わされる新規スチルベン化合物を提供する：

【0017】

【化12】



(II)

ここで：

R_1 は、一般式 $(-O-P(O)(O^-M^+)_2)$ のリン酸エステル塩部分、 $-OPO_3R_7R_8$ 、 R_7R_8 またはスルホン酸アルキルであって、ここで、 M は、金属カチオンまたは塩（例えば、 Na 、 K および Li ）である；

R_2 は、アルキル基またはアンモニウム塩 (NH_4^+) である；そして

R_3 は、アルキル基またはシクロアルキルである。

【0018】

式 I および I' の化合物だけでなくそれらの類似物は、固形腫瘍癌および不要新血管形成に関連した他の疾患（例えば、網膜新生血管形成および再狭窄）、ならびに非悪性新生血管形成の他の状態を処置するのに有用な血管標的化剤 (V T A s) である。さらに具体的には、式 I および I' の化合物は、種々の癌を処置する際に有用であり、これらの癌には、以下が挙げられる（これらに限定されない）：

癌腫（膀胱癌、乳房癌、大腸癌、腎臓癌、肝臓癌、肺（小細胞肺癌を含めて）、食道癌、胆嚢癌、卵巣癌、脾臓癌、胃癌、頸部癌、甲状腺癌、前立腺癌および皮膚癌（扁平上皮癌を含めて））；

リンパ様系列の造血性腫瘍（白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B 細胞リンパ腫、T 細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、有毛細胞リンパ腫およびバーケットリンパ腫を含めて）；

骨髄球性系列の造血性腫瘍（急性および慢性骨髄性白血病、骨髄形成異常症候群および前骨髄球性白血病）；

間充織起源の腫瘍（線維肉腫および横紋筋肉腫を含めて）；

中枢神経系および末梢神経系の腫瘍（星細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫およびシュワン細胞腫を含めて）；および

他の腫瘍（黒色腫、精上皮腫、奇形癌腫、骨肉腫、キセノデローマ ビグメントスム (x

enoderoma pigmentosum)、ケラトクタントーマ(keratocanthoma)、甲状腺濾胞性癌、未分化甲状腺癌およびカポジ肉腫を含めて)。

【0019】

それゆえ、本発明の目的は、チューブリンのアセンブリが微小管に入るのを阻害する薬剤(これは、強力な血管標的化剤である)で処置することによって、網膜および角膜の新血管形成を防止または低減する方法を提供することにある。

【0020】

また、本発明のさらに他の目的は、チューブリンのアセンブリが微小管に入るのを阻害する薬剤(これは、強力な血管標的化剤である)で処置することによって、アテローム性動脈硬化症または再狭窄の発症を防止または低減する方法を提供することにある。

【0021】

本発明の1つまたはそれ以上の実施態様の詳細は、以下で添付の説明で述べられている。本発明を実施または試験する際に、本明細書中で記述したものと同じまたは類似の任意の方法および物質が使用できるものの、今ここでは、好ましい方法および物質を記述する。本発明の他の特徴、目的および利点は、この記述から明らかとなる。本明細書および添付の請求の範囲では、単数形はまた、特に明記しない限り、複数形も含む。他に定義されていない場合は、本明細書中で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術の当業者に一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書中で引用した全ての特許および出版物の内容は、本明細書中で参考として援用されている。

【0022】

(発明の詳細な説明)

本明細書中で定義したように、本発明は、式IおよびIIの化合物およびそれらのプロドラッグ、このような化合物を使用する製薬組成物およびこのような化合物を使用する方法を提供する。

【0023】

本発明の化合物を記述するのに使用される種々の用語の定義は、以下で列挙する。これらの定義は、(特定の場合に限定されていない限り)、個々に、またはそれより大きい基の一部として、いずれかで、本明細書全体を通じて使用されるとき、これらの用語に適用される。

【0024】

満たされていない原子価を有するヘテロ原子は、それらの原子価を満たす水素原子を有すると想定されることに留意すべきである。

【0025】

アルキル基との用語は、単独で、または他の基と組み合わせて、1~8個の炭素原子を含有する低級アルキルであり、直鎖または分枝であり得る。アルキル基は、必要に応じて置換した直鎖、分枝または環状の飽和炭化水素基である。アルキル基は、置換するとき、任意の結合点にて、4個までの置換基R(定義されている)で置換され得る。このアルキル基がアルキル基で置換されていると言われるとき、これは、「分枝アルキル基」と交換可能に使用される。代表的な非置換のこのような基には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、4,4-ジメチルペンチル、オクチル、2,2,4-トリメチルペンチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシルなどが挙げられる。代表的な置換基には、以下の基の1個またはそれ以上が挙げられ得るが、これらに限定されない: ハロ(例えば、F、Cl、Br、I)、ハロアルキル(例えば、CCl₃またはCF₃)、アルコキシ、アルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ(-COOH)、アルキルオキシカルボニル(-C(O)R)、アルキルカルボニルオキシ(-OCOR)、アミノ(-NH₂)、カルバモイル(-NHCOOR-または-OCONHR-)、尿素(-NHCONHR-)またはチオール(-SH)。定義したアルキル基はまた、1個またはそれ以上の炭素-炭素二重結合または1個またはそれ以上の炭素-炭素三重結合を含有し得る。

【0026】

好ましいアルキル基、1～8個の炭素原子を含有する；さらに好ましいアルキル基は、1～6個の炭素原子を含有する。本明細書中で使用するアルキレンは、式 C_nH_{2n} を有する架橋アルキル基を意味する。例には、 CH_2 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ などが挙げられる。

【0027】

本明細書中で使用する「シクロアルキル」との用語は、炭素原子間に交互または共鳴二重結合なしで3～15個の炭素原子を含有するアルキル種である。それは、1～4個の環を含有し得る。代表的な非置換のこのような基には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、アダマンチルなどが挙げられる。代表的な置換基には、以下の基の1個またはそれ以上が挙げられる：ハロゲン、アルキル、アルコキシ、アルキルヒドロキシ、アミノ、ニトロ、シアノ、チオールおよび／またはアルキルチオ。

【0028】

本明細書中で使用する「アリール」との用語は、芳香族性を有する基を意味し、これには、5員および6員の単環式芳香族基（これは、0～4個のヘテロ原子を含有し得る）だけでなく、多環系（これは、少なくとも1個の芳香環を有する）が挙げられる。アリール基の例には、ベンゼン、フェニル、ピロール、フラン、チオフェン、チアゾール、イソチアゾール、イミダゾール、トリアゾール、テトラゾール、ピラゾール、オキサゾール、イソオキサゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジンおよびピリミジンなどが挙げられる。この芳香環は、1個またはそれ以上の環位置にて、上記のような置換基（例えば、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシなど）で置換できる。

【0029】

本明細書中で使用する「低級アルコキシ」との用語は、 $-O-$ アルキル基を意味し、ここで、アルキルは、この上で定義したとおりである。このアルコキシ基は、酸素架橋を介して、その主鎖、アリール基またはヘテロアリール基に結合される。このアルコキシ基は、直鎖または分枝であり得る；しかし、直鎖が好ましい。例には、メトキシ、エチルオキシ、プロポキシ、ブチルオキシ、 t -ブチルオキシ、 i -プロポキシなどが挙げられる。好ましいアルコキシ基は、1～4個の炭素原子を含有し、特に好ましいアルコキシ基は、1～3個の炭素原子を含有する。最も好ましいアルコキシ基は、メトキシである。

【0030】

本明細書中で使用する「ハロゲン」または「ハロ」との用語は、塩素、臭素、フッ素またはヨウ素を意味する。

【0031】

本明細書中で使用する「低級アルキルアミノ」との用語は、1個のアルキル基がアミノ窒素に結合した基（すなわち、 NH （アルキル））を意味する。この NH は、そのアルキル基をアリールまたはヘテロアリールに連結する架橋である。例には、 $NHMe$ 、 $NHEt$ 、 $NHPr$ などが挙げられる。

【0032】

このアミノ酸アシルアミノ基内のアミノ酸アシル基は、そのアミノ酸から誘導されたアシル基である。これらのアミノ酸は、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸および γ -アミノ酸により列挙され得る。好ましいアミノ酸の例には、グリシン、アラニン、ロイシン、セリン、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、スレオニン、バリン、イソロイシン、オルニチン、グルタミン、アスパラギン、チロシン、フェニルアラニン、システイン、メチオニン、アルギニン、 β -アラニン、トリプトファン、プロリン、ヒスチジンなどが挙げられる。好ましいアミノ酸は、セリンである。

【0033】

本明細書中で使用する「プロドラッグ」との用語は、薬剤がインビボで代謝的に変換されて活性薬剤を生成する前駆体形状を意味する。それゆえ、例えば、本発明に従って動物に投与されるコンプレクスタチンA-4リン酸プロドラッグ塩またはコンプレクスタチンA-1リン酸プロドラッグ塩は、代謝活性化を受け、例えば、体内での解離および内生非特異的ホスファターゼへの露出に続いて、インビボで、コンプレクスタチンA-4またはコ

10

20

30

40

50

ンプレクスタチンA-1を再生する。リン酸プロドラッグ塩またはリン酸エステル塩部分は、本明細書中では、交換可能に使用されるが、リン酸エステル塩部分 ($-O-P(O)(O^-M^+)_2$)、または1個のリン酸トリエステル部分 ($-OP(O)(OR)_2$) または1個のリン酸ジエステル部分 ($-O-P(O)(O^-M^+)$ を含み、ここで、Mは、塩であり、そしてRは、任意の適当なアルキルまたは分枝アルキル置換基であるか(2個のR基は、同一アルキル基であり得るか、または混合され得る)、またはベンジル基またはアリール基であるように、選択される。塩Mは、有利には、Na、KおよびLiであるが、本発明は、この局面には限定されない。このリン酸エステル塩部分はまた、($-OP(O)(O^-アルキル)_2$ または ($-OP(O)(O^-NH_4^+)_2$) を含有し得る。

【0034】

本明細書中で使用する「塩」との用語は、薬学的に受容可能な塩であり、これには、酸付加塩(塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、硫化水素、アルキルスルホン酸塩、アリールスルホン酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、乳酸塩および酒石酸塩)；アルカリ金属カチオン(例えば、Na、K、Li)、アルカリ土類金属塩(例えば、MgまたはCa)または有機アミン塩(例えば、PCT国際出願第WO02/22626号または第WO00/48606号で開示されたもの)を挙げることができる。

【0035】

本発明の化合物の全ての立体異性体は、混合物か純粋または実質的に純粋な形状のいずれかで、考慮される。本発明による化合物の定義は、全ての可能な立体異性体およびそれらの混合物を包含する。それは、特に、それらのラセミ形状、および特異的活性を有する単離した光学異性体を包含する。これらのラセミ形状は、物理的方法(例えば、分別再結晶、分離、またはジアステレオマー誘導体の結晶化、またはキラルカラムクロマトグラフィーによる分離)により、分割できる。個々の光学異性体は、通常の方法(例えば、光学活性酸を使う塩形成に続いた結晶化)により、ラセミ化合物から得ることができる。

【0036】

本発明はまた、悪性または非悪性の血管増殖疾患を処置するための血管標的化剤(特に、本明細書中で開示した化学構造を有するチューブリン結合剤)の投与に関する。

【0037】

チューブリン結合剤は、細胞内にて、有糸分裂中に、チューブリン結合補助因子または補助因子-チューブリン錯体に結合することにより、チューブリンアセンブリを阻害し、その分裂を防止して、それにより、細胞の増殖を阻害する。チューブリン結合剤は、チューブリンの重合を阻害する広範囲の種類の化合物を含有し、これらは、一般に、癌の化学療法で有用な腫瘍選択性血管標的化剤としてだけでなく、他の非癌用途(例えば、眼病および再狭窄)として、機能する。

【0038】

血管標的化剤(これはまた、血管損傷剤としても知られている)は、新規種類の抗悪性腫瘍薬であり、これらは、血管新生により形成される既存の血管系を選択的に閉塞、破裂または破壊することにより、固形腫瘍を攻撃する。VTA作用の細胞毒性機構は、抗血管形成のものとは極めて離れている。単一用量のVTAは、既存の腫瘍血管系の急速かつ非可逆的な腫瘍血管の停止を引き起こすことができ、これは、最終的に、低酸素および栄養欠乏を誘発することにより、腫瘍の壊死につながる。他の薬剤は、腫瘍血管系を崩壊されることが知られているが、それらがまた、最大許容用量で、実質的に正常な組織毒性を示すという点で、異なる。対照的に、純粋なVTAは、それらの最大許容用量のうちの僅かな量で、それらの血管停止活性を保持する。

【0039】

1実施態様では、本発明は、眼球組織における悪性または非悪性の血管造瘤性疾患を処置するための血管標的化剤(「VTA」)(特に、チューブリン結合剤)の投与に関する。

【0040】

眼球組織の新血管形成は、血管増殖により特徴付けられる病態であり、種々の程度の視力

10

20

30

40

50

不全を伴う種々の眼病で起こる。非悪性の血管増殖疾患（例えば、湿潤黄斑変性病、増殖性糖尿病性網膜症または未熟児網膜症）を薬理学的に抑制するためのVTAの投与は、処置選択肢が殆どない患者に有益となる可能性がある。他の実施態様では、本発明は、悪性の血管増殖障害（例えば、眼癌）に伴う新血管形成を薬理学的に抑制するためのVTAの投与を提供する。

【0041】

血液網膜関門（BRB）は、特殊な無窓の密接に結合した内皮細胞から構成され、これらは、ある種の物質に対して、網膜毛細管と網膜組織との間の輸送障壁を形成する。網膜症に伴う角膜と網膜との間の新生血管は、異常であり、固形腫瘍に伴う血管と酷似している。チューブリン結合剤、チューブリン重合阻害剤および血管標的化剤は、これらの異常な血管が血液網膜関門との構造上の類似性を共有していないので、それらの血管を攻撃でき得る。チューブリン結合剤は、腫瘍-血管系を処置するのと酷似して、これらの疾患の進行を停止し得る。目へのチューブリン結合剤の局所（非全身）送達には、硝子体内注射、テノン囊下注射、点眼液イオン泳動、および移植片および／またはの挿入物を使用して、達成できる。全身投与は、これらのチューブリン結合剤を、罹患したまたは冒された臓器または組織（この場合、目）から測定可能な距離だけ分離された部位で、血流に投与することにより、達成され得る。好ましい全身投与様式には、非経口投与または経口投与が挙げられる。

【0042】

本発明の化合物はまた、血管病（特に、アテローム性動脈硬化症および再狭窄）を処置する際に使用するように考慮される。アテローム性動脈硬化症は、最も一般的な形態の血管病であり、これにより、重要な臓器への血液供給が不十分となり、その結果、心臓麻痺、脳卒中および腎不全を引き起こす。さらに、アテローム性動脈硬化症は、高血圧および糖尿病に罹っている人だけでなく、喫煙者にも、重大な合併症を引き起こす。アテローム性動脈硬化症は、慢性的血管傷害の1形態であり、ここで、動脈壁にある正常な血管平滑筋細胞（「VSMC」）の一部は、通常、血管緊張を抑制して血流を規制するが、それらの性質を変え、「癌様」挙動を発症する。これらのVSMCは、異常に増殖して、内部血管ライニングに侵入して展開させる物質（成長因子、組織分解酵素および他のタンパク質）を分泌し、血流を阻害して、異常なことに、血管を局所血液凝固により完全に遮断され易くなり、その結果、その動脈で切り離された組織の死を引き起こす。

【0043】

再狭窄、すなわち、矯正手術後の狭窄または動脈狭窄症の再発は、アテローム性動脈硬化症が進行した形態である。最近の証拠は、血管障害の統一仮説を支持しており、ここで、冠動脈狭窄は、冠静脈移植片および心臓同種移植アテローム性動脈硬化症と共に、自発的アテローム性動脈硬化症を引き起こす同じ病原プロセスのずっと進行した形態に相当すると考えることができる（Ip, J. H., ら（1990）J Am Coll Cardiol, 15:1667~1687; Muller, D. W. M. ら（1992）J Am Coll Cardiol, 19:418~432）。再狭窄は、強力な成長調節分子が関与している血管傷害に対する一連の複雑な繊維増殖が原因であり、これらの分子には、血小板由来成長因子（PDGF）および塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）（これはまた、アテローム硬化型外傷の後の段階でも一般的である）が挙げられ、その結果、血管平滑筋細胞の増殖、移動および新生内膜蓄積を引き起こす。

【0044】

再狭窄は、冠動脈バイパス手術（CAB）、動脈内膜切除および心臓移植後に、特に、心臓バルーン血管形成術、アテローム切除術、レーザー切除または血管内ステント設置（各々の場合、患者の3分の1は、6ヶ月までに、動脈閉塞（再狭窄）を再び発症する）後に起こり、症状の再発（または死）の原因となり、しばしば、血管再手術を繰り返す必要がある。アテローム性動脈硬化症の10年にわたる研究および種々の医療処置や外科的処置（血管形成術、バイパス移植および動脈内膜切除を含めて）の一次成功率の改善にもかかわらず、後に再狭窄が原因の二次的な失敗は、患者の30~50%で起こる（Ross 50

、R. (1993) *Nature*, 362:801~809)。

【0045】

この疾患を予防する最も有効な方法は、血管再生手術を繰り返すこと（これは、合併症または死の大きな危険を伴い得、時間と費用がかかり、患者に不便である）ではなく、細胞レベルにある。

【0046】

微小管、すなわち、全ての真核細胞で存在しているオルガネラは、健康で正常な細胞活動に必要である。それらは、細胞分裂に必要な紡錘体の必須成分であり、細胞の形状および他の細胞活動（例えば、運動性、足場、細胞オルガネラ間の移動、細胞外分泌プロセス）

(Dustin, P. (1980) *Sci. Am.*, 243:66-76) を維持するだけでなく、成長因子と細胞表面レセプタとの間の相互作用および細胞内シグナル変換を調節するのに必要である。さらに、微小管は、c-mos 発癌遺伝子およびCD-2キナーゼ（これらは、有糸分裂に入るのを規制し、チューブリンに結合してリン酸化する）の両方として、細胞複製における重大な調節性の役割を果たし (Verde, F. ら (1990) *Nature*, 343:233~238)、また、腫瘍抑制遺伝子 p53 の生成物およびSV-40 のT-抗原の両方は、三元錯体にて、チューブリンに結合する (Maxwell, S. A. ら (1991) *Cell Growth Differen.*, 2:115~127)。微小管は、静止しているのではなく、それらの溶解性タンパク質サブユニットである α -および β -チューブリンヘテロダイマーと動的平衡にある。アセンブリは、生理学的条件下にて、補助因子として、グアニシン三リン酸 (GTP) と、特定の微小管結合した組織化タンパク質が必要である；他方、カルシウムが高く温度が低いと、解重合を引き起こす。

【0047】

微小管とそのサブユニットとの間のこの正常な平衡の妨害は、従って、細胞の分裂および運動だけでなく、微小管に依存した他の活動を乱すと予想される。この戦略を使用して、特定の悪性腫瘍の処置が大きく成功した。実際、微小管阻害剤（例えば、コルヒチンおよびビンカルカロイド）は、最も重要な抗癌剤のうちに入る。これらの微小管阻害剤は、微小管の分解を促進するが、殆どの治療可能な腫瘍（急性リンパ性白血病、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫および生殖細胞腫瘍を含めて）の化学療法だけでなく、他の多くの癌の対症療法でも、重要な役割を果たす。

【0048】

Taxol（登録商標）（パクリタキセル）は、有効な微小管阻害剤であることが明らかとなっている。他の微小管阻害剤（例えば、コルヒチンおよびビンカルカロイド）これらは、微小管の分解を促進する）とは異なり、タキソールは、異常に安定な微小管の形成を促進することにより、有糸分裂および細胞増殖に必要な微小管ネットワークの正常な動的再構築を阻害することにより、作用する (Schiff, P. B. ら (1979) *Nature* 277:665; Schiff, P. B. ら (1981) *Biochemistry* 20:3247)。タキソールの存在下にて、重合に必要なチューブリンの濃度は、著しく低い；微小管の構築は、GTPなしで、低温で起こり、形成された微小管は、希釈、カルシウム、寒冷および阻害薬剤により、解重合にさらに安定となる。Taxol は、重合したチューブリンに可逆的に結合し、他のチューブリン結合薬剤は、タキソールの存在下でも、依然として、チューブリンに結合する。

【0049】

しかしながら、Taxol は、非常に溶解性であり、タキソールの投与に続いて、激しいアレルギー反応が観察されている。さらに、タキソールの投与には、心臓不整脈と同様のアレルギー反応が伴い、それらの発症率は、タキソールの投与量および投与速度により、影響される。

【0050】

再狭窄を防止する際に、微小管阻害剤であるコルヒチンを使用することが研究されているものの、反対の結果が報告されている (Currier ら、[Colchicine I

10

20

30

40

50

nhibits Restenosis After Iliac Angioplasty In The Atherosclerotic Rabbit] (1989) Circ., 80:11~66; O' Keefeら, 「Ineffectiveness Of Colchicine For The Prevention Of Restenosis After Coronary Angioplasty」 (1992) J. Am. Coll. Cardiol., 19:1597~1600を参照)。しかしながら、この方法は、再狭窄を予防または低下させる際に、CA-1またはCA-4のような血管標的化剤を使用することを示唆していない。それゆえ、本発明の方法は、CA-1またはCA-4のような血管標的化剤だけでなくこれらの化合物のプロドラッグを使用して、アテローム性動脈硬化症または再狭窄の発症を予防または低下させることにある。このアテローム性動脈硬化症または再狭窄予防の微小管安定化機構は、タキソールおよびH₂O (重水)を賦子した細胞増殖および移動の類似の実験結果により支持され、これは、異なる根本的な機構により、同程度の微小管効果を発揮する。

【0051】

本発明の製薬組成物は、その予定した投与経路に適合するように処方される。他の化学療法薬の使用と同様に、個々の患者は、担当医が適当と考える様式で、モニターされる。もし、重症の好中球減少または重症の末梢神経障害が起こるなら、またはthe Common Toxicity Criteria of the National Cancer Instituteを使用して、等級2またはそれ以上の高いレベルのムコシテイス (mucositis) が観察されるなら、投薬量はまた、少なくできる。

【0052】

眼に局所投与するための製薬組成物は、眼科用液剤、眼科用ゲル、スプレー、軟膏、灌流および挿入物が挙げられ得る。チューブリン結合剤の局所投与した処方、は、所望の処置効果を達成するのに十分に長い時間にわたって、安定に留まるべきである。それに加えて、この薬剤は、目の表面構造を貫通して、疾患部位にて、相当な量で蓄積しなければならぬ。さらに、局所的に投与された薬剤は、過剰な量の局所毒性をもたらしてはならない。

【0053】

点眼液の形態の眼科用液剤は、一般に、水性媒体からなる。種々の極性を有する広範囲の薬剤に適合させるために、緩衝液、有機担体、無機担体、乳濁液、湿潤剤などを加えることができる。眼科用局所処方のための薬学的に受容可能な担体には、特に、リン酸塩、ホウ酸塩、酢酸塩およびグルコン酸塩緩衝液が挙げられる。薬剤担体には、水、低級アルコールの水混合物、植物油、ポリアルキレングリコール、石油ベースのゼリー、エチルセルロース、オレイン酸エチル、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンおよびミリスチン酸イソプロピルが挙げられ得る。眼科用スプレーは、一般に、点眼液と同じ結果を生じ、同様の様式で処方できる。ある種の眼科用薬剤は、眼球閥門を横切る浸透性に乏しく、点眼液またはスプレーとして投与可能ではない。それゆえ、接触時間を長くして吸収される薬剤の量を多くするために、軟膏が使用され得る。薬剤溶液を使った目の連続的かつ一定の灌流は、結膜嚢にポリエチレン配管を置くことにより、達成できる。その灌流液の流速は、目の連続灌注を生じるミニポンプシステムにより、調節可能である。挿入物は、角膜上に位置付けられるソフトコンタクトレンズと類似しているが、但し、挿入物は、一般に、上部官嚢に置かれるか、それ程頻繁ではないが、開放角膜に装着されるよりもむしろ下部結膜嚢に配置される。挿入物は、一般に、薬剤を放出しつつ、涙液に溶解するか崩壊する生体溶解性物質から構成される。

【0054】

本発明の組成物はまた、全身投与にも処方され得る。全身投与経路の例には、非経口 (例えば、静脈内、皮内、皮下) 投与、経口 (例えば、吸入) 投与、経粘膜投与および直腸投与が挙げられる。非経口投与または皮下投与に使用される溶液または懸濁液には、以下の成分を挙げることができる: 無菌希釈液 (例えば、注射用の水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒); 抗菌薬 (例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン); 酸化防止剤 (例えば

、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム）；キレート化剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸）；緩衝液（酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩）、および等張性調節剤（例えば、塩化ナトリウムまたはブドウ糖）。そのpHは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）で調節できる。その非経口製剤は、アンプル、使い捨て注射器または複数用量バイアル（これは、ガラスまたはプラスチック製である）に封入できる。

【0055】

注射可能用途に適当な製薬組成物には、滅菌注射可能溶液または分散液を即座に調製するための滅菌水溶液（この場合、水溶性である）または分散液および滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与に適当な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL (BASF, Parsippany, N. J.) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) が挙げられる。いずれの場合でも、その組成物は、容易に注射可能となる程度まで、無菌でなければならず、流動性であるべきである。それは、製造および保存条件下にて安定でなければならず、また、微生物（例えば、細菌および真菌）の汚染作用から防腐されなければならない。この担体は、溶媒または液状分散媒体であり得、これは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステル、それらの適当な混合物を含有する。その適当な流動性は、例えば、被覆（例えば、レシチン）の使用により、分散液の場合にて必要な粒径の維持により、そして界面活性剤の使用により、維持できる。微生物の作用は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、バラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）により、防止できる。多くの場合、この組成物には、等張剤（例えば、ショ糖、多価アルコール（例えば、マンニトール、ソルビトール）、塩化ナトリウム）を含有させることが好ましい。これらの注射可能組成物は、その組成物にて吸収遅延剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を使用することにより、吸収が延長できる。

【0056】

滅菌注射可能溶液は、必要なら、上で列挙した種々の他の成分と共に、適当な溶媒中にて、必要な量で、これらの活性化化合物（例えば、血管標的化剤）を混合すること、続いて、フィルター滅菌することにより、調製される。一般に、分散液は、この活性化化合物を滅菌ビヒル（これは、塩基性分散媒体と、上で枚挙したものにより、防止できる。多くの場合、この組成物には、好ましい調製方法には、真空乾燥法および凍結乾燥法があり、これらは、この活性成分+追加の所望成分（これは、先に滅菌フィルターした溶液中に存在している）を生じる。

【0057】

経口組成物は、一般に、希釈剤または食用担体を含有する。それらは、ゼラチンカプセルに封入できるか、または錠剤に圧縮できる。経口療法投与のためには、この活性化化合物は、賦形剤と混合でき、そして錠剤、トローチまたはカプセルの形状で使用できる。経口組成物は、うがい薬として使用する流動担体を使用して調製でき、ここで、この流動担体中の化合物は、経口的に適用され、スウィッシュされ喀痰されるか、飲み込まれる。薬学的に適当な結合剤および/または補助物質は、その組成物の一部として、含有できる。これらの錠剤、トローチ、丸剤、カプセルなどはまた、以下の成分または同様な性質の化合物のいずれかを含有し得る：結合剤（例えば、微結晶セルロース、トラガカントガムまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）；崩壊剤（例えば、アルギン酸、Primogelまたはコンスターチ）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes）；グライダント（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味料（例えば、スクロースまたはサッカリン）；または香料（例えば、ハッカ、サリチル酸メチルまたはオレンジ香料）。

【0058】

吸入により投与するには、これらの化合物は、加圧した容器またはディスペンサー（これは、適当な推進剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含有する）または噴霧器から、

エアロゾル噴霧形態で送達される。

【0059】

全身投与または、経粘膜手段または経皮手段により、行うことができる。経粘膜投与または経皮投与には、この処方には、その障壁を浸透するのに適当な浸透剤が使用される。このような浸透剤は、一般に、当該技術分野で公知であり、例えば、経粘膜投与には、清浄剤、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻内スプレーまたは座剤を使用することにより、達成できる。経皮投与には、これらの活性化化合物は、当該技術分野で一般に公知であるように、軟膏、ゲルまたはクリームに処方される。

【0060】

これらの化合物はまた、座剤（例えば、通常の座剤基剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリド）を使って）または直腸送達用の保持浣腸剤の形態で、調製できる。

【0061】

本発明の化合物はまた、有糸分裂阻害剤（これは、血管形成術後に再狭窄が再発する問題を防止するために、ステント上に被覆（または結合）される）として作用させることにより、冠動脈疾患を処置するのに有用であることが判明し得る。

【0062】

上記血管標的化剤に加えて、本発明はまた、製薬組成物および処方の使用を包含し、これらは、薬学的に受容可能な担体、希釈剤または賦形剤（例えば、水、グルコース、ラクトース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースがあるが、これらに限定されない）だけでなく、当該技術分野で一般に公知の他の薬学的に受容可能な担体、希釈剤または賦形剤と共に、血管標的化剤を含有する。

【0063】

本明細書中で使用する「薬理学的に有効な量」、「薬学的に有効な投薬量」または「治療有効量」との用語は、組織、システム、動物またはヒトの研究者または臨床医が求める生体応答または医療応答を誘発する薬剤または医薬品の量を意味する。

【0064】

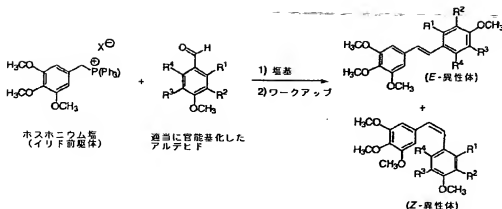
本発明に従ったVTAsおよびチューブリン結合剤の全身投与および非全身投与は、哺乳動物（特に、ヒト）に投与するように処方されると解釈される。しかしながら、本発明は、この点には限定されず、処方または、動物に投与するための獣医学的指針に従って、調製され得る。

【0065】

本明細書中で記述した化合物の大部分は、適当に置換したアルデヒドと適当に置換したリニリドとの間のウィッティヒ反応により、合成的に調製できる。そのアルデヒド部分およびリド部分は、標的スチルベノイドに必要な官能基を慎重に取り込むことができるように、同様に、容易に交換できる（一般的な合成プロトコールについては、スキーム1および2を参照）。

【0066】

【化13】

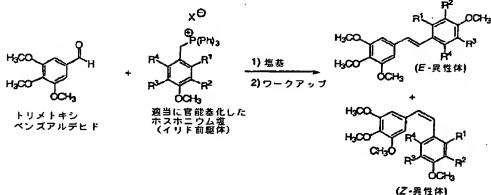


10

図式 1 : スチルベノイドの一般合成経路-I 部。

【0067】

【化14】



20

図式 2 : スチルベノイドの一般合成経路-II 部。

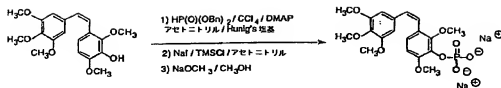
【0068】

図式 1 および 2 で概説した一般合成アプローチを使用して、多種多様な官能化スチルベノイド化合物を調製した。各場合において、出発物質は、購入した (Aldrich Chemical Co. および/または Acros (Fisher Scientific) など) か、文献に記載された経路により、1 工程または 2 工程で調製した。これらの好ましい化合物の各々は、そのスチルベノイドの A 環に 3, 4, 5-トリメトキシフェニルモチーフを含有すると共に、B 環の残りの位置にて、立体的および/または電子的な偏りのある基の点で、さらに官能化されていることに注目することが重要である。好ましい立体化学配置は、Z であるが、しかしながら、対応する E 異性体は、容易に得られ、これらの E 異性体のいくつかは、VTAs としての活性を有し得ることは、当業者に容易に明らかとなるはずである。各場合において、その遊離フェノール部分は、図式 3 の化合物の 1 つについて例示されているように、その対応するホスフェートプロドラッグ要素に容易に変換できる。1 個より多い遊離フェノール部分が存在している場合、部分的にホスホリル化した化合物の混合物は、図式 3 の試薬の限られた量を使用することにより、生成できる。

40

【0069】

【化15】



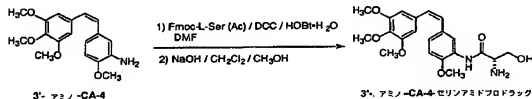
図式 3 : スチルベノイドホスフェートプロドラッグの代表的な合成。

【0070】

これらのフェノール性スチルベノイド類似物の論理的な発生の伸展は、そのフェノール部分をアミン官能性で置換することにある。このアミンは、さらに変性されて、アミン酸残基とアミド結合を形成でき、生物学的に、プロドラッグとして機能する。その親遊離アミンは、依然として、チューブリンとの結合相互作用によって、生物学的に機能するのに対して、そのアミドプロドラッグ連鎖（例えば、セリンアミド）は、プロドラッグ構築物として、働く。この概念は、CA-4 の 3'-アミノ類似物およびその対応するセリンアミドを調製することにより、Ajinomoto Pharmaceuticals Co., Inc. により開発が成功した。Ajinomoto Inc. により使用された方法と類似の合成方法を使用して（図式 4）、本発明者は、種々の官能化スチルベノイド化合物およびそれらの対応するセリンアミド同属種を調製した。

【0071】

【化16】



図式 4 : セリンアミドプロドラッグの代表的な調製。

【0072】

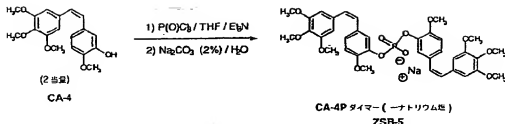
これらの化合物の一部は、セリンアミドおよびリン酸塩またはエステルの両方を含有することが重要である。それに加えて、これらの化合物の一部は、フェノール官能性とアミド官能性との間で慎重に架橋されたリン酸塩を含有できる。セリンは、これらのプロドラッグ処方で使用される好ましいアミノ酸を含有し得るものの、他のアミノ酸も同様に、利用され得ることに注目することが重要である。これらのプロドラッグへの変換の全ては、本明細書中で記述した方法だけでなく、他の標準的な合成方法（これらは、当業者に明らかである）を使用することにより、達成できる。

【0073】

VTA s としてのスチルベノイド誘導体の生体利用能および薬物動態を向上させる目的で、CA-4 Pダイマーを調製した（図式 5）。

【0074】

【化17】



図式 5 : CA-4 P ダイマーの合成。

10

【0075】

類似の様式で、図式 I I I で図示したものと非常に類似した合成戦略により容易に調製できる種々の他のスチルベノイドダイマーが予想される。それに加えて、他の塩の対イオン (例えば、リチウム、カリウムなど) は、おそらく同程度の有効性を有し、使用され得る。

【0076】

これらのダイマーの潜在的な生物学的利点は、以下の戦略に基づいている：

A) これらのダイマーは、非特異的アルカリホスファターゼまたは他の酵素による酵素的開裂を起こしにくい基質であることが判明し得る。

【0077】

B) このホスファターゼ (その分子のプロドラッグ部分) の開裂を遅くすることにより、その薬物動態は、好ましい様式で変えられ得、その結果、血管標的化に点で、改良された機能を生じる。

20

【0078】

C) これらのダイマーは、酵素開裂によって生物学的に強力なスチルベノイド V T A の 2 個の分子を達達するという事実から、特に興味深い。

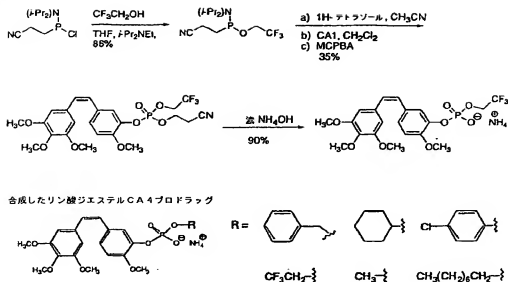
【0079】

高い血管標的化性能につながる改良された薬物動態の問題の検討するために、種々のリン酸トリエステルおよびジエステルを調製した。親リン酸モノエステルプロドラッグ CA 4 P により示された有望な生物活性に基づいて、数種のリン酸ジエステル CA 4 プロドラッグを調製した。これらの化合物の一般的な合成は、図式 6 で詳述する。CA 4 から誘導された (同様に、他のフェノール性コンプレクスタチンだけでなくジオール (例えば、CA 1) から誘導された) 莫大な種類のジエステルは、本明細書中で記述した方法を使用して、容易に調製できることは、当業者に明らかである。

30

【0080】

【化18】



10

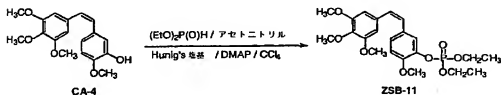
図式6：スチルベノイドリン酸ジエステル類似物の調製。

【0081】

これらの新規化合物を設計する前提は、それらのスチルベノイドダイマー（先に記述した）について概説し開発したものと類似している。それらの配位子（代表的な例について、図式6および7を参照）の合成には、類似の合成戦略を使用した。これらの化合物は、明らかに、（CA-4と比較して）低い細胞毒性を示し、このことは、それらがホスフェート部分の酵素開裂をしにくい基質であり得ることを示唆しており、これは、高いインビボ薬物動態プロファイルの点で、改良されたVTA sについて有利であることが判明し得る。

【0082】

【化19】



図式7：スチルベノイドリン酸トリエステルの代表的な合成。

【0083】

本発明は、以下の実施例および調製例（これらは、本発明を製造し使用する様式および方法を記述しており、限定ではなく例示である）を参照して、さらに規定される。本発明の目的および対象から逸脱することなく、物質および方法の両方について、多くの改良を実施し得ることが当業者に明らかとなる。

【実施例】

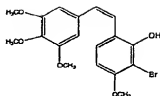
【0084】

（実施例1：2'-ヒドロキシ-3'-プロモ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ（Z）-スチルベン（ZSB-26A））

【0085】

【化20】

50



A. 3, 4, 5-トリメトキシベンジルトリフェニルホスホニウムブロマイドの調製 10
 CBr₄ (5.10 g、15.4 mmol) のよく攪拌したアセトン (80 mL) 溶液に、0℃で、N₂ 下にて、3, 4, 5-トリメトキシベンジルアルコール (2.23 g、11.3 mmol) およびトリフェニルホスフィン (4.00 g、15.3 mmol) を加えた。12時間後、その混合物をセライトで濾過し、減圧下にて溶媒を濾過して、褐色オイルとして、臭化ベンジルを得た。次いで、このオイルをCH₂Cl₂ (50 mL) に溶解し、そしてPPh₃ (3.25 g、12.4 mmol) を加えた。その反応系を一晩加熱し、次いで、氷冷水を加え、その生成物をCH₂Cl₂ で抽出することにより、単離した。有機相をブラインで洗浄し、そして硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧中に溶媒を蒸発させると、粗固形物が得られ、これをエチルアルコール/ヘキサンから再結晶して、3, 4, 5-トリメトキシベンジルトリフェニルホスホニウムブロマイド (5.0 g、85 20 %) を得た。

[0086]

B. 2-ヒドロキシ-3-ブロモ-4-メトキシベンズアルデヒドの調製
 酢酸 (1重量%) を含有するエタノール (100 mL) を還流しつつ、2-ヒドロキシ-4-メトキシベンズアルデヒド (3.04 g、20 mmol) を酢酸水銀 (1当量、20 mmol) で処理し、続いて、NaBr水溶液で処理すると、収率80%で、有機水銀化合物の混合物が得られた。この混合物を、少量の酢酸を含有するCHCl₃ 中にて、1当量の臭素で処理した。シリカゲル (ヘキサン中の30% EtOAcで溶出) で精製すると、2-ヒドロキシ-3-ブロモ-4-メトキシアルデヒド (2.11 g、47.2 %) が得られた。 30

[0087]

C. 2- (t-ブチルジメチルシリル) -3-ブロモ-4-メトキシベンズアルデヒドの調製

2-ヒドロキシ-3-ブロモ-4-メトキシベンズアルデヒド (1.96 g、8.5 mmol) のDMF (15 mL) 攪拌溶液に、ジイソプロピルエチルアミン (3.0 mL) を加え、続いて、t-ブチルジメチルシリルクロライド (TBSCl、1.91 g、12.8 mmol) を加えた。その反応混合物を、室温で、30分間攪拌し、この混合物に、水 (20 g) を加えた。次いで、この混合物をエーテル (3×25 mL) で抽出した。そのエーテル溶液を水 (25 mL) および飽和NaHCO₃ 溶液 (2×15 mL) で洗浄した。溶媒を蒸発させて、オイル (2.54 g、7.06 mmol、83.1 %) として、 2- (t-ブチルジメチルシリル) -3-ブロモ-4-メトキシベンズアルデヒドを得た。 40

[0088]

D. 2'-オキシ- (t-ブチルジメチルシリル) -3'-ブロモ-3, 4, 4', 5'-テトラメトキシ- (Z) -スチルベンの調製

5-トリメトキシベンジルトリフェニルホスホニウムブロマイド (1.57 g、3 mmol) のTHF (50 mL) 懸濁液に、-15℃で、(アルゴン下にて)、ブチリチウム (1.5 mL、2 Mヘキサン、3 mmol) を加えた。得られた深紅溶液を、室温で、30分間攪拌させた。2-ヒドロキシ-3-ブロモ-4-メトキシベンズアルデヒド (0.991 g、2.8 mmol) を加え、その反応混合物を3時間攪拌し続けた。この 50

反応混合物を水冷 H_2O で希釈し、そしてエーテル(3×25ml)で抽出した。そのエーテル溶液を水で洗浄し、そして溶媒を蒸発させて、2'-オキシ-(t-ブチルジメチルシリル)-3'-ブプロモ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシスチルベンのZおよびE混合物(混合物1.20g、2.36mmole、78.7%)を得た。

【0089】

E. 2'-ヒドロキシ-3'-ブプロモ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベンの調製

2'-オキシ-(t-ブチルジメチルシリル)-3'-ブプロモ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシスチルベンのZおよびE混合物(743mg、1.46mmole)を含有するDMF(7ml)溶液に、KF(84mg、1.46mmole)およびHBr(0.17ml、1.46mmole)を加えた。その反応をTLCでモニターした。2日目に、他のHBr(0.17ml)を加えた。この反応系を、2日間攪拌し続けた。その溶液に水(15ml)を加え、この溶液を酢酸エチル(3×15ml)で抽出した。その抽出物を水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして回転蒸発した。その残留物をシリカゲルカラムに適用し、そしてヘキサン：酢酸エチル(7：3)で抽出して、2'-ヒドロキシ-3'-ブプロモ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン(256mg、0.64mmole、43.8%)を得た。

【0090】

【化21】

1H -NMR,(ppm, δ): 6.95(1H, d, $d=11.5$ Hz), 6.56(1H, d, $J=8.5$ Hz), 6.52(1H, d, $J=11.5$ Hz),

6.44(2H, s), 3.80(3H, s), 3.61(3H, s), 3.54(3H, s)

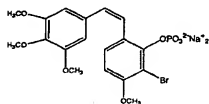
^{13}C -NMR,(ppm, δ): 155.00, 153.38, 150.72, 128.40, 126.07, 122.48, 118.59, 133.00, 103.93,

103.49, 60.98, 56.44, 56.15.

(実施例2: 2'-リン酸二ナトリウム-3'-ブプロモ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン(ZSB-26B)の調製)

【0091】

【化22】



A. 2'-O-ビス(ベンジル)ホスホリル-3'-ブプロモ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベンの調製

隔壁、温度計およびアルゴン入口を備えたフラスコにて、2'-ヒドロキシ-3'-ブプロモ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン(250mg、0.63mmole)をアセトニトリル(10ml)に溶解した。-25℃まで冷却した後、四塩化炭素(5当量、3.15mmole、0.6ml)を加え、その溶液を5分間攪拌した。注射器を使って、ジイソプロピルエチルアミン(0.65ml、2当量)を加え、続いて、DMAP(18mg、0.3当量、0.15mmole)を加えた。1分後、その反応温度が-20℃未満で留まるような速度で、亜リン酸ジベンジル(0.25ml、1.26mmole、2.0当量)のゆっくりとした添加を開始した。その反応が完了した後(TLC分析により、1時間)、0.5M KH_2PO_4 (5ml)を加え、その溶液を室温まで暖め、そして酢酸エチル(3×20ml)で抽出した。合わせた溶媒抽出物を水(

25 ml) および飽和 NaCl (25 ml) 洗浄し、次いで、乾燥した。濾過し溶媒を除去すると、オイルが得られ、これを、シリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル、4:1) でクロマトグラフィーにかけて、透明粘性物質として、2-O-ビス (ベンジル) ホスホリル-3-ブromo-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ- (Z) -ースチルベン (390 mg, 94.5%) を得た。

[0092]

B. 2'-リン酸二ナトリウム-3'-ブromo-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ- (Z) -ースチルベン (212 mg, 0.324 mmol) およびヨウ化ナトリウム (97.2 mg, 0.648 mmol) の無水アセトニトリル (5 ml, 乾燥フラスコ中、アルゴン下) の無水アセトニトリル (5 ml, 乾燥フラスコ中、アルゴン下) 溶液に、(激しく攪拌しつつ)、クロロトリメチルシラン (70 mg, 0.648 mmol, 0.082 ml, 2当量) をゆっくりと加えた。20分間攪拌した後、TLC分析により、出発物質が見られなくなった。十分な水を加えて、その塩を溶解し、そして10%チオ硫酸ナトリウム水溶液 (5滴) を加えることより、変色を除いた。溶媒を分離し、その水相を酢酸エチル (4×10 ml) で抽出した。この合わせた抽出物を減圧下で濃縮し、得られた発泡体を無水メタノール (2 ml) に溶解した。ナトリウムメトキシド (95%, 34 mg, 0.648 mmol) を一度に加え、その溶液を9時間攪拌した。そのメタノールを減圧下にて除去し、水-エタノールから固形物を再結晶して、白色粉末 (64 mg, 0.12 mmol, 37.0%) を得た。

[0093]

[化23]

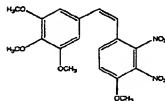
¹H NMR (ppm, δ): 6.98 (1H, d, d=11.5 Hz), 6.58 (1H, d, J=8.5 Hz), 6.50 (1H, d, J=11.5 Hz),

6.48 (2H, s), 3.83 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.55 (3H, s). ³¹P NMR (ppm, δ): -0.36

(実施例3: 2', 3'-ジニトロ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ- (Z) -ースチルベン (ZSB-3B))

[0094]

[化24]



無水ジクロロメタン (25 mL) 中の4-メトキシ-2, 3-ジニトロベンズアルデヒド (2.94 mmol) および3, 4, 5-トリメトキシベンジルトリフェニルホスホンイウムブロマイド (1.54 g, 2.94 mmol, 1.0当量) に、NaH (0.424 g, 17.67 mmol, 6.0当量) を加えた。その反応混合物を、室温で、約7時間攪拌し、そしてTLCでモニターした。この反応を、水を加えることによりクエンチし、その有機層を分離し、その水層をジクロロメタン (3×25 mL) で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、そして減圧下にて濃縮して、橙色スラッシュを得た。これに、約15 mLのジクロロメタンを加え、そして一晩冷却した。その粗混合物をフラッシュクロマトグラフィーにかけて、2', 3'-ジニトロ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ- (Z) -ースチルベン (0.581 g, 1.48 mmol, 固形物

分51%)を単離した。

【0095】

【化25】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ

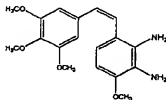
3.69 (6H, s), δ 3.82 (3H, s), δ 3.95 (3H, s), δ 6.30 (2H, s), δ 6.49 (1H, d, J=11.86), δ 6.77

(1H, d, J=11.84 Hz), δ 7.09 (1H, d, J=8.93 Hz), δ 7.36 (1H, d, J=8.9 Hz).

(実施例4: 2', 3'-ジアミノ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (ZSB-3B))

【0096】

【化26】



20

アセトン-水(2:1)の混合物中の2', 3'-ジニトロ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン(0.422g, 1.08mmol)のよく攪拌した溶液を、50℃まで加熱した。次いで、チオ硫酸ナトリウム(1.88g, 10.81mmol, 10.0当量)を加え、その反応混合物を、6時間にわたって、還流状態まで加熱した。その反応系を室温まで冷却し、そして水を加えた。その有機層を分離し、その水層を酢酸エチル(4×25mL)で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、そして減圧中にて濃縮した。次いで、その混合物を分取TLCにかけて、2', 3'-ジアミノ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベンを得た。

30

【0097】

【化27】

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃): δ3.61 (6H, s), δ 3.80 (3H, s), δ 3.82 (3H, s), δ 6.38 (1H, d,

J=8.44 Hz), δ 6.48 (1H, d, J=12.12 Hz), δ 6.49 (2H, s), δ 6.52 (1H, d, J=12.06 Hz), δ 6.66 Hz

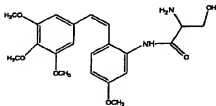
(1H, d, J=8.43 Hz).

(実施例5: 2'-セリンアミド-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (ZSB-45))

40

【0098】

【化28】



50

A. 2'-Fmoc-L-セリンアミド-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン¹⁰の調製

2-アミノ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (0.114 g、0.362 mmol) のよく攪拌した無水DMF (2 mL) 溶液に、室温で、DCC (0.101 g、0.489 mmol)、Fmoc (Ac)-L-セリンアミド (0.173 g、0.467 mmol) およびHOBt・H₂O (0.0702 g、0.520 mmol) を加えた。21.5時間後、EtOAcを加え、その混合物を濾過した。その濾液を水で5回洗浄し、そしてブラインで2回洗浄し、その有機相を硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を蒸発させた後、その黄色オイルをノーマル相分取TLC (60%ヘキサン-EtOAc) で2回精製して、2'-Fmoc-L-セリンアミド-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (0.1308 g、収率54%) を得た。

【0099】

【化29】

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.13

(br, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.77 (d, 2H, J=7Hz), 7.57 (br, 2H), 7.40 (br, 2H), 7.31 (br, 2H), 7.13

(d, 1H, J=8.5), 6.70 (dd, 1H, J=8.5, 2.4 Hz), 6.32 (br, 2H), 6.22 (s, 2H), 5.27 (m, 1H), 4.54

(m, 2H), 4.40 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.48 (s, 6H), 1.95 (s, 3H).

20

B. 2'-セリンアミド-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン³⁰の調製
2'-Fmoc-L-セリンアミド-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (0.131 g、0.226 mmol) をジクロロメタン1.5 mLに溶解し、そしてMeOH (1.5 mL) および2N-水酸化ナトリウム水溶液0.22 mL (0.0176 g、0.44 mmol) を加えた。その反応混合物を、室温で、18時間攪拌した後、ジクロロメタンを加え、その有機相を水で1回洗浄し、そしてブラインで2回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして溶媒を除去した。得られたオイルをノーマル相分取TLC (95%CH₂Cl₂-MeOH) で精製して、2', 3'-ジアミノ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (52.9 mg、67%) を得た。

【0100】

【化30】

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.65 (s, 1H), 8.02 (d, 1H, J=2.6 Hz), 7.15 (d, 1H, J=8.5 Hz),

6.68 (dd, 1H, J= 8.5, 2.6 Hz), 6.60 (d, 1H, J=12.1 Hz), 6.49 (d, 1H, J=12 Hz), 3.81 (s, 3H),

3.79 (s, 3H), 3.72 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.60 (s, 6H), 3.36 (t, 1H, J=5.3 Hz), 1.80 (br, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 171.8, 159.5, 152.8, 137.7, 135.8, 132.6, 131.8, 130.1, 124.3,

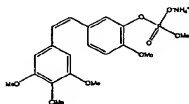
119.9, 110.9, 105.8, 105.2, 65.1, 60.9, 56.5, 55.9, 55.5.

30

(実施例6: CA-4 Pメチルエステル、アンモニウム塩 (Oxi-com-209))⁴⁰

【0101】

【化31】



(工程A)

2-シアノエチルジソプロピルクロロホスホラミダイト 0.60 mL (2.69 mmol)、無水ヒューニツビ塩基 0.90 mL (5.2 mmol) および無水メタノール (Aldrich) 0.14 mL (3.46 mmol) を、無水THF (15 mL) 中で、アルゴン下にて、攪拌しつつ、反応させた。その反応を20時間進行させ、そしてTLCでモニターした (ニンヒドリンの染みに白色-橙色のスポットができ、これに続いて、酢酸エチル-ヘキサン 50:50 混合物の溶媒フロントにかけると、ヘキサン中の5%酢酸エチル中で、 $R_f = 0.12$ を有する)。この後、次いで、その反応混合物に、約2.5 g のシリカゲル (これは、トリエチルアミンで予め中和した) を加え、そして回転蒸発で溶媒を除去することにより、その固形生成物をシリカゲル上に吸着させた。乾燥したシリカゲルを Biotage FLASH 試料注入 (SIM) カートリッジに集め、そしてシリカゲル充填FLASH 20Sカラム (Biotage FLASH 40クロマトグラフィーシステムにて、ヘキサン中の7%酢酸エチルを使う、圧力=15 psi) で溶出した。(注記: 試料溶出前、その内のシリカゲルを約250 mLの15%トリエチルアミン-メタノール溶液で中和することにより調製し、その後、約100 mLの7%酢酸エチル (ヘキサン溶液中) でリンスした)。6~10個の画分をブールし、そして回転乾燥して、収率60% (初期クロロホスホラミダイトに対して) で、0.372 g (1.60 mmol) の生成物を得た。

【0102】

(工程B)

ストッパー付き丸底フラスコにて、アルゴン下で、アセトニトリル (Fluka) 中の0.45 M 1-ヘテトラゾール溶液に、工程1の生成物 0.3551 g (1.529 mmol) を加えた。次に、アルゴン下にて、攪拌しつつ、注射器からこの溶液へと、コンプレクスタチンA4 (CA4) の無水塩化メチレン溶液 3.7 mL (0.1515 g/mL = 0.56 g, 1.70 mmol) をゆっくりと滴下した。この反応は、50:50の酢酸エチル-ヘキサン混合物を使用して、TLCで再度モニターした。生成物の $R_f = 0.70$ (uvで見え、CA4基が空気酸化すると褐色に変わり、また、ニンヒドリンで橙色に発色した) であり、約33時間反応させた。

【0103】

(工程C)

この後、この反応混合物に、m-クロロペルオキシ安息香酸 (70~75%、Across) 0.449 g (約2 mmol) を加え、そして生成物の形成は、前のように、TLCでモニターした。10分間で、酸化ジエステルのはほぼ完全な変換が明らかとなったが、その反応を2時間実行した。その生成物のTLCモニタリングにより、50:50の酢酸エチル-ヘキサンにて、約0.30の R_f を有する広いスポットが明らかとなった。この生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製して、0.250 g (0.540 mmol、収率35%) の生成物を得、これは、1-Hおよび31-P NMRにより、純粋であることが明らかとなった。

【0104】

(工程D)

工程3から得た純粋な生成物 0.2122 g (0.4598 mmol) を80:20のメタノール-塩化メチレン溶液10 mLに溶解し、そこに、濃アンモニア溶液 (28~30%のアンモニア、Across) 0.15 mL (1.14 mmol、約2.5当量) を加え、これを、24時間にわたって反応させた。この3-アミノプロピオニトリル副生成物、アンモニアおよび溶媒を、回転エバポレーションに次いで真空ポンプにより除去した。これにより、約90%の収率 (これは、1-Hおよび31-P NMRで確認した) および90%を超える純度 (これは、HPLCおよび毛细管電気泳動による) で、正しい生成物が得られた。

【0105】

本明細書中で記述した手順または本明細書中で記述した手順の改良 (これは、当業者に公

10

20

30

40

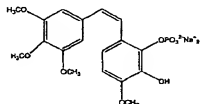
50

知である)を使用して、以下の追加化合物を調製した:

2'-リン酸二ナトリウム-3'-ヒドロキシ-3,4,4',5-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン(ZSB-1A)

[0106]

[化32]



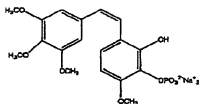
10

[0107]

2'-ヒドロキシ-3'-リン酸二ナトリウム-3,4,4',5-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン(ZSB-2A)

[0108]

[化33]



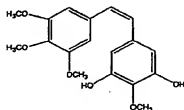
20

[0109]

3',5'-ジヒドロキシ-3,4,4',5-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン(ZSB-1B)

[0110]

[化34]



40

(0.27g, 80%). ^1H NMR (300MHz): 3.67(6H, s), 3.79(3H, s), 3.86(3H, s), 4.96(2H, bs), 6.23(1H, d, $J=12.28\text{Hz}$), 6.36(1H, d, $J=12.2\text{Hz}$), 6.43(2H, s), 6.56(2H, s). ^{13}C NMR (75.47 MHz): 55.92, 60.94, 61.14, 106.2, 108.68, 129.19, 130.07, 132.29, 133.69, 134.02, 137.27, 148.62, 152.83.

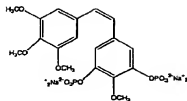
[0111]

3',5'-リン酸四ナトリウム-3,4,4',5-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン(ZSB-2B)

50

【0112】

【化35】



10

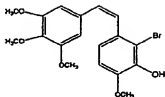
°

【0113】

2'-プロモ-3'-ヒドロキシ-3,4,4',5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (ZSB-16)

【0114】

【化36】



20

(530mg, 51.5%, 固体). HNMR (ppm, δ): 6.83(1H, d, $J=8.5$), 6.70(1H, d, $J=8.5$ Hz), 6.56(2H, s), 6.42(2H, s), 3.94(3H, s), 3.88(3H, s), 3.65(6H, s) CNMR(ppm, δ): 153.13, 146.36, 143.54, 137.54, 132.43, 131.52, 131.10, 129.14, 121.97, 110.61, 109.87, 106.44, 61.30, 56.83, 56.22

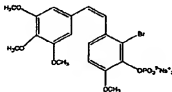
°

【0115】

2'-ブromo-3'-リン酸二ナトリウム-3,4,4',5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (ZSB-17)

【0116】

【化37】



30

(120.2 mg, 0.23mmol, 71.4%) $^1\text{H-NMR}$ (ppm, δ): 6.67(1H, q), 6.52(1H, d, $J=11.9$ Hz), 6.43(1H, d, $J=12.4$ Hz), 6.36(2H, s), 3.63(3H, s), 3.55(6H, s), 3.47(3H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm, δ , CDCl_3): 152.32, 133.50, 130.96, 130.74, 129.96, 125.06, 111.69, 106.71, 61.17, 56.11. P-NMR (ppm, δ): 1.06.

40

°

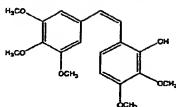
【0117】

2'-ヒドロキシ-3,3',4,4',5-ペンタメトキシ-(Z)-ースチルベン (ZSB-18)

【0118】

50

【化38】



(1.49g 4.3mmol, 82.7%) $^1\text{H-NMR}$ (ppm, δ , CDCl_3): 7.27(1H, d, $J=12.3\text{Hz}$), 7.08(1H, d, $J=8.3\text{Hz}$), 7.03(1H, d, $J=13.5\text{Hz}$), 6.75(2H, s), 6.53(1H, d, $J=8.6\text{Hz}$), 3.92(6H, s), 3.90(6H, s), 3.88(3H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm, δ , CDCl_3): 153.70, 152.05, 147.73, 137.83, 135.86, 134.36, 128.09, 123.12, 122.15, 118.11, 104.43, 103.66, 61.39, 56.50, 56.27.

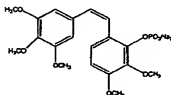
10

【0119】

2'-リン酸二ナトリウム-3, 3', 4, 4', 5-ペンタメトキシ (Z)-ースチルベン (ZSB-19)

【0120】

【化39】



20

(97mg, 0.21mmol, 42%, 固体) $^1\text{H-NMR}$ (ppm, δ , D_2O): 7.25(1H, d, $J=12.3\text{Hz}$), 7.08(1H, d, $J=8.3\text{Hz}$), 6.93(1H, d, $J=13.6\text{Hz}$), 6.83(1H, d, $J=8.6\text{Hz}$), 6.71(2H, s). $^{31}\text{P-NMR}$ (ppm, δ , D_2O): 2.97

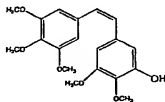
30

【0121】

3'-ヒドロキシ-3, 3', 4, 4', 5-ペンタメトキシ (Z)-ースチルベン (ZSB-20)

【0122】

【化40】



40

(560mg 1.62mmole, 62.3%) $^1\text{H-NMR}$ (ppm, δ , CDCl_3): 6.88(2H, s), 6.80(1H, s), 6.72(2H, s), 6.63(1H, s), 3.92(12H, s), 3.86(3H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm, δ , CDCl_3): 153.79, 152.84, 149.83, 135.70, 133.83, 133.37, 128.70, 128.30, 106.47, 103.84, 102.86, 61.40, 60.83, 56.52, 56.27.

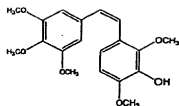
【0123】

3'-ヒドロキシ-2', 3, 4, 4', 5-ペンタメトキシ (Z)-ースチルベン (ZSB-27A)

50

【0124】

【化41】



(251.5 mg, 0.726 mmol, 72.6%) ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.73 (d, J=8.7 Hz, 1H), 6.58 (d, J=12.3 Hz, 1H), 6.52-6.44 (m, 4H), 5.80 (s, 1H), 3.85, 3.79 (s, s, 9H), 3.63 (s, 6H). CDCl₃: δ 153.1, 147.5, 145.8, 138.9, 137.4, 133.0, 130.4, 125.4, 124.2, 120.9, 120.6, 106.8, 106.4, 61.3, 61.2, 56.7, 56.6, 56.2.

10

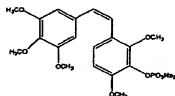
。

【0125】

3'-リン酸二ナトリウム-3, 3', 4, 4', 5-ペンタメトキシ-(Z)-スチルベン (ZSB-27B)

【0126】

【化42】



(117.8 mg, 0.25 mmol, 73.7%, 固体). ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ 6.70 (d, J=8.4 Hz, 1H), 6.55 (d, J=12.1 Hz, 5.5 Hz, 1H), 3.70, 3.56, 3.48 (s, s, s, 15H). ¹³C-NMR (300 MHz, D₂O): δ 153.2, 152.3, 150.9, 137.1, 136.9, 136.0, 134.0, 126.5, 124.2, 124.1, 108.3, 106.7, 61.2, 61.1, 56.2, 56.1. ³¹P-NMR (300 MHz, D₂O): δ 1.43

30

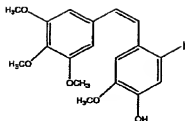
。

【0127】

4'-ヒドロキシ-2'-ヨード-3, 4, 5, 5'-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン (ZSB-29A)

【0128】

【化43】



(0.72 g, 1.5 mmol, 88%, 油状物). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 3.67 (s, 3H); 3.73 (s, 6H); 3.84 (s, 3H); 6.09 (s, 1H); 6.39 (d, $J = 12.1$, 1H); 6.47 (d, $J = 12.1$, 1H); 6.53 (s, 2H); 6.74 (d, $J = 1.6$, 1H); 7.30 (d, $J = 1.6$, 1H).

10

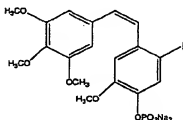
°

【0129】

4'-リン酸二ナトリウム-2'-ヨード-3, 4, 5, 5'-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン (ZSB-29B)

【0130】

【化44】



20

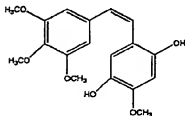
°

【0131】

2', 5'-ジヒドロキシ-3, 4, 4', 5'-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン (ZSB-33A)

【0132】

【化45】



40

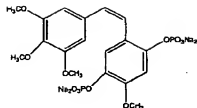
°

【0133】

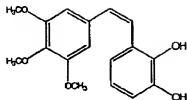
2', 5'-リン酸二ナトリウム-3, 4, 4', 5'-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン (ZSB-33B)

【0134】

【化46】

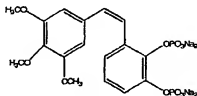


【0135】
 2', 3' -ジヒドロキシ-3, 4, 5-トリメトキシ (Z) -ースチルベン (ZSB-36A)
 【0136】
 【化47】



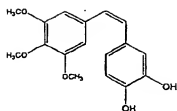
(0.5g, 1.65mmol, 43.3%) ¹H-NMR (CDCl₃, 300MHz): δ 3.63 (6H, s, 2*OCH₃); 3.83 (3H, s, OCH₃), 5.10 (1H, s, OH), 5.50 (1H, s, OH), 6.47 (2H, s, H-2, H-6), 6.53 (1H, d, J=12.04Hz, -CH=CH-), 6.60 (1H, d, J=12.06Hz, -CH=CH-), 6.92 (3H, m, H-4', H-5', H-6').

【0137】
 2', 3' -ジホスフェート-3, 4, 5-トリメトキシ (Z) -ースチルベン (ZSB-36B)
 【0138】
 【化48】



(0.036g, 0.071mmol, 59.1%, 固体) ¹H-NMR (300MHz, D₂O): δ 3.69 (6H, s, 2*OCH₃); 3.77 (3H, s, OCH₃), 6.66 (2H, s, H-2, H-6), 6.73 (1H, d, J=12.02Hz, -CH=CH-), 6.86 (1H, d, J=12.21Hz, -CH=CH-), 6.98 (2H, m, H-5', H-6'), 7.24 (20H, m, 4*C6H6), 7.36 (1H, d, J=7.14Hz, H-4') PPMR (300Mhz, D₂O) δ -3.27, -3.88.

【0139】
 3', 4' -ジヒドロキシ-3, 4, 5-トリメトキシ (Z) -ースチルベン (ZSB-37A)
 【0140】
 【化49】



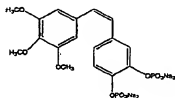
°

【0141】

3', 4' ジホスフェート-3, 4, 5-トリメトキシ-(Z)-スチルベン (ZSB-37B)

【0142】

【化50】



20

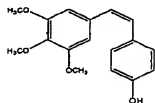
°

【0143】

4'-ヒドロキシ-3, 4, 5-トリメトキシ-(Z)-スチルベン (ZSB-40A)

【0144】

【化51】



30

°

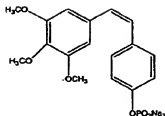
【0145】

(ZSB-40B) 4'-ホスフェート-3, 4, 5-トリメトキシ-(Z)-スチルベン

【0146】

【化52】

40



(85 mg, 0.20 mmol, 30.0%). $^1\text{H-NMR}$ (ppm, δ): 7.13 (1H,d, $J=8.3$ Hz), 7.00(1H,d, $J=8.3$ Hz), 6.59 (2H,s), 6.56 (1H,d, $J=13.00$), 6.45(1H,d, $J=12.1$ Hz), 3.67(3H,s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm, δ): 153.00, 133.50, 130.00, 129.80, 129.76, 125.00, 120.05, 119.50, 108.00, 106.44, 61.00, 56.01. PNMR (ppm, δ): 0.10.

10

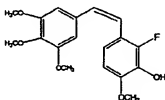
°

【0147】

2'-フルオロ-3'-ヒドロキシ-3,4,4',5-テトラメトキシ (Z)-ースチルベン (ZSB-41A)

【0148】

【化53】



20

(126 mg, 0.37 mmol, 74.8%). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 6.79 (t, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.57-6.50 (m, 5H), 3.86(s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.80,(s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 153.2, 150.6, 147.9, 147.4, 137.6, 134.4, 134.2, 132.8, 131.6, 122.33, 122.29, 120.27, 1119.25, 119.08, 106.3, 61.29, 56.78, 56.25

30

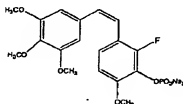
°

【0149】

(ZSB-41B) 2'-フルオロ-3'-リン酸二ナトリウム-3,4,4',5-テトラメトキシ (Z)-ースチルベン

【0150】

【化54】



40

°

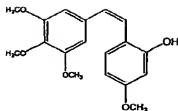
【0151】

2'-ヒドロキシ-3,4,4',5-テトラメトキシ (Z)-ースチルベン (ZSB-46A)

50

【0152】

【化55】



(620mg, 55%, 固体). HNMR(ppm, δ , CDCl₃): 7.43(1H, J=8.6Hz), 7.20(1H, d, J=16.3Hz), 6.94(1H, d, J=16.3Hz), 6.74(2H, s), 6.55(1H, d, J=8.3Hz), 3.92(6H, s), 3.88(3H, s), 3.81(3H, s).

10

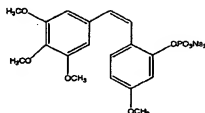
。

【0153】

2'-リン酸二ナトリウム-3, 4, 4', 5'-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン (ZSB-46B)

【0154】

【化56】



20

HNMR(ppm, δ , D₂O): 7.49(1H,d), 7.36 (1H,d), 6.94 (4H,m), 6.57 (1H,d), 3.77(6H,s), 3.71(3H,s), 3.65 (3H,s). PNMNR(ppm, δ , D₂O): 1.26.

30

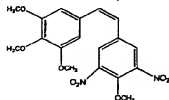
。

【0155】

3, 5-ジニトロ-3, 4, 4', 5'-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン (ZSB-13)

【0156】

【化57】



40

。

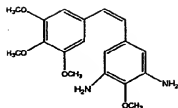
【0157】

3', 5'-ジアミン-3, 4, 4', 5'-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン (ZSB-14)

【0158】

【化58】

50



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 360 MHz) δ 6.56 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, $J=12.2$ Hz), 6.34 (d, 1H, $J=12.2$ Hz), 6.14 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.70 (s, 6H).

10

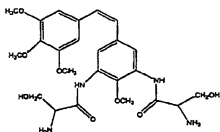
°

【0159】

3', 5'-ジセリンアミド-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (ZSB-15)

【0160】

【化59】



20

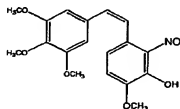
°

【0161】

2'-ニトロソ-3'-ヒドロキシ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (ZSB-28A)

【0162】

【化60】



(80 mg, 0.23 mmole, 65%, 固体) $^1\text{H NMR}$: 3.64 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$); 3.81 (s, 3H, OCH_3); 3.92 (s, 3H, OCH_3); 6.30 (s, 2H, aryl); 6.59 (d, $J=12$, 1H); 6.68 (d, $J=12$, 1H); 6.78 (d, $J=8.4$, 1H); 6.92 (d, $J=8.4$, 1H).

40

°

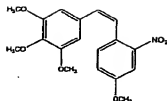
【0163】

2'-ニトロ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (ZSB-39A)

【0164】

【化61】

50



(5.29 g, 81% 収率) $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.59 (d, 1 H, $J=2.7$ Hz), 7.24 (d, 1 H, $J=8.8$ Hz), 7.01 (dd, 1H, $J=8.7, 2.7$ Hz), 6.80 (d, 1 H, $J=11.9$ Hz), 6.62 (d, 1 H, $J=12.0$ Hz), 6.28 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.62 (s, 6H).

10

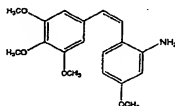
°

【0165】

2'-アミノ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (ZSB-39B)

【0166】

【化62】



20

(0.817 g, 38%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 360 MHz) δ 7.03 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 6.51 (s, 2H), 6.49 (d, 1H, $J=11.6$ Hz), 6.42 (d, 1H, $J=12$ Hz), 6.30 (dd, 1H, $J=8.4, 2.5$ Hz), 6.25 (d, 1H, $J=2.4$ Hz), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.64 (s, 6H), 1.55 (br, 1H).

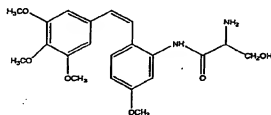
°

【0167】

2'-セリンアミド-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (ZSB-45)

【0168】

【化63】



40

(0.817 g, 38%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 360 MHz) δ 7.03 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 6.51 (s, 2H), 6.49 (d, 1H, $J=11.6$ Hz), 6.42 (d, 1H, $J=12$ Hz), 6.30 (dd, 1H, $J=8.4, 2.5$ Hz), 6.25 (d, 1H, $J=2.4$ Hz), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.64 (s, 6H), 1.55 (br, 1H).

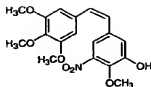
°

【0169】

3'-ヒドロキシ-5'-ニトロ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-ースチルベン (ZSB-43)

50

{ 0 1 7 0 }
 { 化 6 4 }

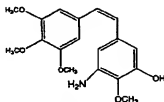


¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 3.72 (s, 6H), 3.85 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 6.42 (d, 1H, J=12.1 Hz), 6.47 (s, 2H), 6.61 (d, 1H, J=12.1), 7.16 (d, 1H, J=2.0 Hz), 7.39 (d, 1H, J=2.0 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 56.04, 61.00, 62.54, 106.06, 117.286, 120.73, 126.81, 131.34, 132.38, 133.92, 137.92, 139.80, 142.64, 150.15, 153.18.

10

。 { 0 1 7 1 }
 3'-ヒドロキシ-5'-アミノ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン (Z S B-4 4)

{ 0 1 7 2 }
 { 化 6 5 }

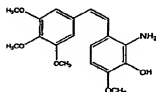


20

(60 mg, 15%, 油状物). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 3.71 (s, 6H), 3.78 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 6.27 (d, 1H, J=1.9), 6.35 (d, 1H, J=1.9), 6.41 (d, 2H, J=1.5), 6.54 (s, 2H).

。 { 0 1 7 3 }
 2'-アミノ-3'-ヒドロキシ-3, 4, 4', 5-テトラメトキシ-(Z)-スチルベン (Z S B-4 8)

{ 0 1 7 4 }
 { 化 6 6 }

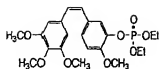


30

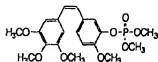
(90.5 mg, 82%, 油状物). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 3.64 (s, 6H), 3.81 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 6.32 (d, 1H, J=8.4), 6.45 (d, 1H, J=12.1), 6.51 (d, 1H, J=12.0), 6.51 (s, 2H), 6.68 (d, 1H, J=8.4). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 55.7, 56.1, 60.8, 101.1, 105.9, 117.6, 120.1, 125.7, 130.9, 132.1, 132.2, 132.6, 137.2, 145.7, 152.7.

40

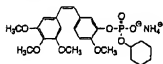
。 CA 4 P ジエチルエステル (O x i - c o m 1 5 7)
 { 0 1 7 5 }
 { 化 6 7 }



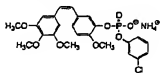
CA4Pジメチルエステル (O x i - c o m 184)
【0176】
【化68】



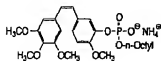
CA4Pシクロヘキサンエステル、アンモニウム塩 (O x i - c o m 191)
【0177】
【化69】



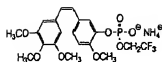
CA 4 P 4-クロロベンジルエステル、アンモニウム塩 (O x i - c o m - 1 9 2)
[0178]
[化70]



CA 4 P n-オクチルエステル、アンモニウム塩 (O x i - c o m 2 1 0)
[0 1 7 9]
[化 7 1]



CA4P トリフルオロエタンエステル、アンモニウム塩 (O x i - c o m 211)
【0180】
【化72】



【0181】

(実施例7：生物活性)

本発明の化合物の薬理特性は、多数の薬理アッセイで確認され得る。例示した薬理アッセイは、本発明の化合物の数種を使って実行した。

10

【0182】

A. MTT細胞毒性アッセイ

指数関数的な成長を、1時間および5日間にわたって、以下の化合物で処理した。生体評価のために、不溶性化合物を少量(0.3%)のDMSOで処方した。十分に確立された手順(この種のアッセイの一般プロトコルについては、Berridgeら(1996)を参照)に従って、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロマイドを使用して、比色MTTアッセイにより、細胞生存度を決定した。これらの結果は、表2で示す。

【0183】

(表2)

20

【0184】

【表2-1】

化合物	IC50 @ 1時間 (uM)	IC50 @ 5日間 (uM)
ZSB-2B	25	1
ZSB-3B	2.4	0.0043
ZSB-16	2	0.0067
ZSB-26A	3.07	0.016

30

【0185】

【表2-2】

ZSB-27	16	0.016
ZSB-39	2	0.008
ZSB-41A	8	0.015
ZSB-43	8	1.3
ZSB-45	10	0.05
ZSB-46A	43	0.068
Oxi-com183	8	0.26
Oxi-com191	35	0.13
Oxi-com209	38	0.07
Oxi-com210	25	0.07

40

B. 血管停止アッセイ

蛍光ビードアッセイを使用して、腫瘍を有するマウスにおいて、以下の化合物の血管効果を評価した。0.5 × 10⁶ 個の培養したMHEC5-T細胞をFox Chase C

50

B-17 SCIDマウスに右脇腹に皮下注射することにより、MHEC-5 T血管内皮腫を樹立し、300 mm³ の大きさに成長させた後、単一用量の生理食塩水コントロールまたは化合物を i. p. 注射した。処理の24時間後、マウスに、尾静脈にて、0.25 mlの希釈したFluoSphèreビーズ（生理食塩水中で1:6）を静脈内注射し、そして3分後に殺した。定量蛍光顕微鏡を使用して、8 μmの厚さの腫瘍凍結切片を直接検査した。定量化については、各群において処理した3個の腫瘍の3切片の画像分析を検査し、血管停止により、単位組織面積（mm²）あたりの血管面積をコントロールの百分率で表した。これらの結果は、表3で示す。

【0186】

（表3）

【0187】

【表3-1】

化合物	% 血流停止 (100mg/kg)
ZSB-2B	65
ZSB-21	46
ZSB-27B	41
ZSB-29B	43

【0188】

【表3-2】

ZSB-33B	51
ZSB-39B	50
ZSB-45	43
Oxi-com192	90
Oxi-com210	89

（他の実施態様）

本発明は、その詳細な説明と関連して記述されているものの、前述の記述は、例示であって、本発明の範囲（これは、添付の請求の範囲で規定される）を限定するとは解釈されないことが理解できるはずである。

【0189】

図面は、必ずしも縮尺ではなく、事実上、概念的なものにすぎないこともまた、理解できるはずである。

【0190】

以下の参考文献の内容は、本明細書中で参考として援用されている。

【0191】

【化73-1】

10

20

30

40

Aleksandrak, K., *et al.*, (1998). "Antimitotic Activity of Diaryl Compounds with Structural Features Resembling Combretastatin A-4." Anti-Cancer Drugs 9: 545-550.

Bedford, S. B., *et al.*, (1996). "Synthesis of Water-Soluble Prodrugs of the Cytotoxic Agent Combretastatin A-4." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 6(2): 157-160.

Berridge M. V., *et al.*, (1996). "The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays the use Tetrazolium salts" Biochemica 4: 15-19.

Brown, M. L., *et al.*, (2000). "Comparative Molecular Field Analysis of Colchicine Inhibition and Tubulin Polymerization for Combretastatins Binding to the Colchicine Binding Site on Beta Tubulin." Bioorganic and Medicinal Chemistry 8: 1433-1441. 10

Chen, Z., *et al.*, (2000). "Preparation of New Anti-Tubulin Ligands through a Dual-Mode, Addition-Elimination Reaction to a Bromo-Substituted α,α -Unsaturated Sulfoxide." Journal of Organic Chemistry 65(25): 8811-8815.

Cushman, M., *et al.*, (1992). "Synthesis and Evaluation of Analogues of (Z)-1-(4-methoxyphenyl)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethane as Potential Cytotoxic and Antimitotic Agents." Journal of Medicinal Chemistry 35(12): 2293-2306.

Dark, *et al.*, (1997). "Combretastatin A4, an Agent that Displays Potent and Selective Toxicity toward Tumor Vasculature." Anticancer Research 57: 1829-1834. 20

[0 1 9 2]

[14 7 3 - 2]

del Rey, B., *et al.*, (1999). "Leishmanicidal Activity of Combretastatin Analogues and Heteroanalogues." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9: 2711-2714.

Deshpande, V. H., *et al.*, (1992). "Synthesis of Combretastatin D-2." Tetrahedron Letters 33(29): 4213-4216.

El-Zayet, A. A. E., *et al.*, (1993). "In vitro Evaluation of the Antineoplastic Activity of Combretastatin A-4, a natural product from *Combretum cafferum*." Anticancer Drugs 4: 19-25.

Galbraith, S. M., *et al.*, (2001). "Effects of Combretastatin A4 Phosphate on Endothelial Cell Morphology In Vitro and Relationship to Tumour Vascular Targeting Activity in Vivo." Anticancer Research 21: 93-102.

10

Griggs, J., *et al.*, (2001). "Potent Anti-Metastatic Activity of Combretastatin-A4." International Journal of Oncology 19: 821-825.

Gwaltney, S. L., *et al.*, (2000). "Novel Sulfonate Analogues of Combretastatin A-4: Potent Antimitotic Agents." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 11: 871-874.

Hatanaka, T., *et al.*, (1998). "Novel B-ring Modified Combretastatin Analogues: Syntheses and Antineoplastic Activity." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 8: 3371-3374.

Hori, K., *et al.*, (2001). "Stoppage of Blood Flow in 3-methylcholanthrene-induced Autochthonous Primary Tumor due to a Novel Combretastatin A-4 derivative, AC7700, and its Antitumor Effect." Medical Science Monitor 7(2): 26-33.

20

Hori, K., *et al.*, (1999). "Antitumor Effects due to Irreversible Stoppage of Tumor Tissue Blood Flow: Evaluation of a Novel Combretastatin A-4 Derivative, AC7700." Jpn. J. Cancer Research 90: 1026-1038.

Iyer, S., *et al.*, (1998). "Induction of Apoptosis in Proliferating Human Endothelial Cells by the Tumor Specific Antiangiogenesis Agent Combretastatin A-4." Cancer Research 58: 4510-4514.

Katsuyoshi, H., *et al.*, (1999). "Antitumor Effects due to Irreversible Stoppage of Evaluation of a Novel Combretastatin A-4 Derivatives, AC7700." Jpn. J. Cancer Research 90: 1026-1039.

30

Maya, A. B. S., *et al.*, (2000). "Design, Synthesis, and Cytotoxic Activities of Naphthyl Analogues of Combretastatin A-4." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 10: 2549-2551.

McGown A.T., *et al.*, (1989). "Structural and Biochemical Comparison of the Anti-mitotic Agents Colchicine, Combretastatin A-4 and Amphetamine." Anti-cancer Drug Design 3: 249-254.

McGown A.T., *et al.*, (1990). "Differential Cytotoxicity of Combretastatins A1 and A4 in Two Daunorubicin-Resistant P388 Cell Lines." Cancer Chemotherapy and Pharmacology 26: 79-81.

40

[0 1 9 3]

[化 7 3 - 3]

Medarde, M., *et al.*, (1998). "Synthesis and Antineoplastic Activity of Combretastatin Analogues: Heterocombretastatins." Eur J Nucl Med 33: 71-77.

Medarde, M., *et al.*, (1999). "Synthesis and Pharmacological Activity of Diarylindole Derivatives. Cytotoxic Agents Based on Combretastatins." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9: 2303.

Medarde, M., *et al.*, (1995). "Synthesis and Pharmacological Activity of Combretastatin Analogues. Naphthylcombretastatin and Related Compounds." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 5(3): 229-232.

Nihei, Y., *et al.*, (1999). "A Novel Combretastatin A-4 Derivative AC 7700, Shows Marked Antitumor Activity against Advanced Solid Tumors and Orthotopically Transplant Tumors." Jpn. J. Cancer Research 90: 1016-1025.

Ohsumi, K., *et al.*, (1998). "Syntheses and Antitumor Activity of Cis Restricted Combretastatins: 5 Membered Heterocyclic Analogues." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 8: 3153-3158.

Pedley, R. B., *et al.*, (2001). "Eradication of Colorectal Xenografts by Combined Combretastatin A-4 3-O- Phosphate." Cancer Research 61: 4716-4722.

Pettit, George R. Combretastatin A-4 Prodrug-Anti-Tumor Chemotherapy. US Patent No. 5,561,122.

Pettit, George R. Cell Growth Inhibitory Macrocyclic Lactones Denominated Combretastatin D-1 and D-2. US Patent No. 4,940,726.

Pettit, George R., Sheo B. Singh. Combretastatin A-4 – Tubulin Polymerization Inhibitor; Antitumor Agent. US Patent No. 4,996,237.

Pettit, G. R., *et al.*, (1999). "Antineoplastic Agents. 410. Asymmetric Hydroxylation of *trans*-Combretastatin A-4." Journal of Medicinal Chemistry 42: 1459-1465.

Pettit, G. R., *et al.*, (1998). "Antineoplastic Agents. 379. Synthesis of Phenstatin Phosphate." Journal of Medicinal Chemistry 41: 1688-1695.

Pettit, G. R., *et al.*, (1995). "Antiangioplastic agents 322. Synthesis of combretastatin A-4 prodrugs." Anti-cancer Drug Design 10: 299-309.

Pettit, G. R., *et al.*, (1982). "Isolation and Structure of Combretastatin." Canadian Journal of Chemistry 60: 1374-1376.

Pettit, G. R., and John W. Lippert (2000). "Antineoplastic Agents 429. Syntheses of the Combretastatin A-1 and Combretastatin B-1 prodrug." Anti-cancer Drug Design 15: 203-216.

Pettit, G. R., Sheo Bux Singh (1987). "Isolation, Structure, and Synthesis of Combretastatin A-2, A-3, and B-2." Canadian Journal of Chemistry 65: 2390.

[0 1 9 4]
[1 7 3 - 4]

Pinney, K. G., *et al.*, (2000). "Synthesis and Biological Evaluation of Aryl Azide Derivatives of Combretastatin A-4 as Molecular Probes for Tubulin." Bioorganic and Medicinal Chemistry 8: 2417-2425.

Rey, B. d., *et al.*, (1999). "Leishmanicidal Activity of Combretastatin Analogues and Heteroanalogues." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9: 2711-2714.

Russell, G., *et al.*, (1995). "Inhibition of [H] Mebendazole Binding to Tubulin by Structurally Diverse Microtubul Inhibitors which Interact at the Colchicine Binding Site." Biochemistry and Molecular Biology International 35(6): 1153-1159.

Sackett, D. L. (1993). "Podophyllotoxin, Steganacin and Combretastatin: Natural Products that Bind at the Colchicine Site of Tubulin." Pharmac. Ther. 59: 163-228.

Schwikkard, S., *et al.*, (2000). "Bioactive Compounds from *Combretum erythrophyllum*." Journal of Natural Products 63: 457-460.

Sello, G., *et al.*, (1996). "Using a Canonical Matching to Measure the Similarity Between Molecules: The Taxol and the Combretastatin A1 Case." Advances in Molecular Similarity 1(243-266).

Shirai, R., *et al.*, (1998). "Asymmetric Synthesis of Antimitotic Combretadioloxane with Potent Antitumor Activity Against Multidrug Resistant Cells." Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 8: 1997-2000.

Shirai, R., *et al.*, (1997). "Synthesis of Conformationally Restricted Combretastatins." Heterocycles 46: 145-148.

Springer Matthew L., *et al.*, (2000). "Angiogenesis monitored by perfusion with a space-filling microbead suspension." Molecular Therapy 1: 82-87.

Tan, L. P., *et al.*, (1975). "Effects of Indole Alkaloids and Related Compounds on the Properties of Brain Microtubular Protein." Biochem. Sec. Trans. 3(1): 121-124.

Tozer, G. M., *et al.*, (2001). "Mechanisms Associated with Tumor Vascular Shut-Down Induced by Combretastatin A-4 Phosphate: Intravital Microscopy and Measurement of Vascular Permeability." Cancer Research 61: 6413-6422.

Watts, M. E., *et al.*, (1997). "Effects of Novel and Conventional Anti-Cancer Agents on Human Endothelial Permeability: Influence of Tumour Secreted Factors." Anticancer Research 17: 71-76.

Zhao, S., *et al.*, (1999). "Positron Emission Tomography of Murine Liver Metastases and the Effects of Treatment by Combretastatin A-4." Eur J Nucl Med 26: 231-238.

【図面の簡単な説明】

【0195】

【図1】図1は、時間の経過に伴う腫瘍の血流に対するCA-4PおよびCA-1Pの効果の比較である。各化合物の血管停止性能は、マウス血管内皮腫(MHEC-T)腫瘍(n=3)を皮下移植したSCIDマウスで測定した。各場合において、100mg/kgの薬剤を単一用量で注入し、そして殺す3分前に、尾静脈を通して、蛍光ビーズを加えた。血流の低下は、蛍光顕微鏡で定量し、そして生理食塩水対照で処理したこれらの動物で観察された血流の百分率として表した。

【図2】図2は、ヒト乳癌のヌードマウスモデルにおけるCA1-PおよびCA-4Pの抗腫瘍成長活性の比較である。マウス (n=3) を、この実験の最初の5日間、毎日1回、処理した (3. 2、6. 3、12. 5または25 mg/kg)。これらの腫瘍の一部を、この実験の42日目から始まって、さらに5日間、再処理した。

【図3】図3は、スチルペノイドVTAファルマコフォアの顕著な構造-活性関係 (SAR) の描写である。これらの特徴は、CA-4の分子構造において保持され、最適なチューブリン結合活性および血管停止活性に重要である。

【図1】

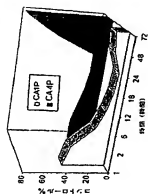


Figure 1.

【図2】

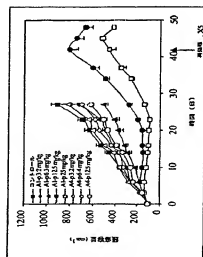


Figure 2.

【図 3】

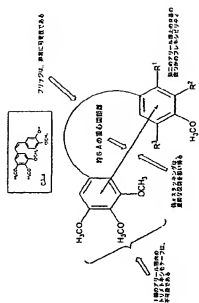


Figure 3. アフラクル/イソアフラクルの置換基の構造

W/O 930326028

PC 12156214491

FUNCTIONALIZED STILBENE DERIVATIVES AS IMPROVED VASCULAR TARGETING AGENTS

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to new stilbenoid compounds and their pro-drug forms, which serve as potent vascular targeting agents useful for the treatment of solid tumor cancers and other diseases associated with unwanted neovascularization.

More particularly, the present invention relates to retinoid-binding stilbenoid analogs structurally related to combretastatin A-1 and combretastatin A-4.

10

BACKGROUND OF INVENTION

The discovery of the natural product collectively known as the combretastatins from a willow tree (*Combretum affinis*) in South Africa initiated a new era in the development of antineoplastic agents which inhibit the assembly of tubulin into microtubules. Combretastatin

15 A-4 (CA-4) and combretastatin A-1 (CA-1), which have the structures:



CA-4



CA-1

WO 03/055008

PCT/02/04497

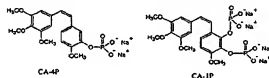
are especially potent in terms of *in vitro* cytotoxicity against human cancer cell lines and in their ability to inhibit the assembly of tubulin into microtubules through a direct haemostatic on the colchicine binding site on β -tubulin.

It is interesting and instructive to note that while both CA-4 and CA-1 are potent inhibitors of tubulin assembly and are strongly cytotoxic against human cancer cell lines (Table 1), both of these *in vitro* assays suggest that CA-4 is more active biologically than CA-1.

Table 1. *In Vitro* Evaluation of Combretastatin and Combretastatin Derivatives

	Inhibition of Tubulin Polymerization (IC ₅₀)	MTT Cytotoxicity (IC ₅₀) at 1 hour	MTT Cytotoxicity (IC ₅₀) at 5 hours
CA-4	1-2 nM	0.1 nM	0.05 nM
CA-1	2-4 nM	10 nM	0.05 nM
CA-4P	>40 nM	0.8 nM	0.092 nM
CA-1P	>40 nM	3.2 nM	0.0046 nM

However, when both of these analogs are converted to their corresponding prodrug forms (CA-4P and CA-1P accordingly) and evaluated *in vivo* in terms of tumor vascular shut-down (Fig. 1) and tumor growth delay (Fig. 2), then it is apparent that CA-1P is eight to ten-fold more active than CA-4P in SCID mice. CA-4P and CA-1P have the structures:



WU 636200W

PCT/US03/04497

- In the case of CA-1P, the most probable biological mode of action ultimately appears to be an enzymatic cleavage by non-specific alkaline phosphatase (or a related enzyme) converting CA-1P (which is not active with tubulin) to the parent CA-1 (which is active with tubulin). CA-1 inhibits the assembly of cytoskeletal tubulin into microtubules resulting in a morphological change in the endothelial cells lining the microvessels of tumors. This morphological change causes the endothelial cells to "round-up" which results in an inability of the microvessels to sustain blood flow. Blood clotting and other events ensue which ultimately result in death of the surrounding tumor tissue. Healthy tissues are, for the most part, not affected even though the compound is administered systemically. Several
- possibilities exist for this selectivity including (but not limited to): (a) the possibility that there is enhanced activity or expression of nonspecific alkaline phosphatase in the micro-environment of the endothelial cells lining the tumor microvessels; (b) potential differences in the uptake itself between tumor healthy cells and *endothelium*, rapidly proliferating endothelial cells in the tumor microvessels which cause enhanced disruption of the cellular system(s) ultimately process in the tumor microenvironment; (c) tumor cells are known to have "leaky" vessels and it is possible that some of the improved tumor growth delay is due to the compound (as parent drug or prodrug) leaving the blood vessels and entering the cytosol around the tumor where it can form a "supply pool" which ultimately enters the tumor cell itself and (as the parent compound) functions as an anti-mitotic agent inhibiting cellular division during metaphase of the cell cycle. The enhanced (10 fold) activity *in vivo* of CA-1P may be due, in part, to the pharmacokinetics associated with the cleavage of both of the phosphate groups (perhaps one cleaves more rapidly than the other) and the subsequent interaction of the parent diphenol (or perhaps one, or both, of the monophenolbimosphonates) with tubulin.
- It has therefore been an object of the studies which led to the present invention to demonstrate and confirm that the enhanced activity of CA-1P may not be due entirely to the substitution pattern in the B-ring of 2,3-diphosphate salts, but rather may be due to a change in pharmacokinetics associated with a 2-alkenoid compound which incorporates a 3,4,5-trimethoxyphenyl motif in the A-ring, and a 4'-methoxy, 3'-O-Phosphate, along with the incorporation of an additional group (with either an electronic or steric bias) as C-2', C-5', or C-6'. Compounds of this basic structural pattern may demonstrate good bioavailability and favorable pharmacokinetics which result in no improved interaction with tubulin and enhanced efficacy as VTAs. It should be readily apparent to anyone skilled in the art that

WQ 4362608

PCT/US03/04497

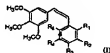
although the new compounds described herein have a trimethoxymethyl substitution pattern in the A-ring, it is a logical extension to vary the positions of these methoxy groups in the C-2, C-3, C-4, C-5, and C-6 positions. Substitution patterns of this type may also result in compounds active as VTAs.

A variety of studies have suggested that the 3,4,5-trimethoxy substitution pattern on the A-ring and the 4-methoxy moiety on the B-ring are important structural features of the pharmacophore for these stilbenoid analogs (Fig. 3). Accordingly, the inventors have maintained these functionalities in most of the new molecules and have included further substitution patterns around the B-ring. The present invention and the compounds which are a part thereof is not limited in this respect, however, and substitution by other than a 4-methoxy moiety on the B-ring is contemplated. It is the conclusion of the present invention that the improved *in vivo* activity of CA-1P (as related to CA-4P) is not due solely to the presence of a diphosphate moiety, but rather may have a strong tie to the pharmacokinetics of this compound including the enzymatic cleavage of the phosphate group (presumably by nonspecific alkaline phosphatase), subsequent inhibition of tubulin assembly resulting in morphological changes (rounding-up) of the immature endothelial cells lining the microvessels of tumors, and the resulting inability of these microvessels to sustain blood flow. Additional pharmacokinetic parameters such as reversibility of tubulin binding and perhaps incorporation of the parent CA-1 in the cytosolic fluid around the tumor cell itself may also play key biological roles.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to novel stilbene compounds and more particularly to tubulin binding stilbenoid analogs structurally related to doxorubicin A-1 and A-4. The synthesis of these new compounds is disclosed herein, together with experiments that demonstrate their activity *in vitro* and *in vivo*.

In a first aspect the present invention provides a novel stilbene compound represented by the structure:



WQ 83935048

PCT/US04/04407

wherein:

R_1 , R_4 and R_5 is independently H, OH, lower alkyl, NH_2 , NO_2 , F , NH-R_6 , halogen, a phosphate ester salt moiety of the general formula

($-\text{O-P}(\text{O})(\text{O}^-\text{M})_2$), wherein M is a metal cation or salt such as Na, K and Li, or -
 $\text{OPO}_3\text{R}_7\text{R}_8$;

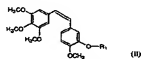
R_2 is H, OH, lower alkyl, NH_2 , NO_2 , NH-R_6 , or phosphate ester salt moiety of the general formula ($-\text{O-P}(\text{O})(\text{O}^-\text{M})_2$), wherein M is a metal cation or salt such as Na, K and Li; or - $\text{OPO}_3\text{R}_7\text{R}_8$, wherein NH_2 or OH may cyclize with R_4 ;

R_3 is H, lower alkyl, or phosphate ester salt moiety of the general formula ($-\text{O-P}(\text{O})(\text{O}^-\text{M})_2$), wherein M is a metal cation or salt such as Na, K and Li or -
 $\text{OPO}_3\text{R}_7\text{R}_8$;

R_6 is an aridic acid acylamino group; and

R_7 and R_8 is independently lower alkyl, cycloalkyl, aryl or an ammonium salt (NH_4^+).

In a second aspect the present invention provides a novel stilbene compound represented by the structure:



wherein:

R_1 is a phosphate ester salt moiety of the general formula ($-\text{O-P}(\text{O})(\text{O}^-\text{M})_2$), wherein M is a metal cation or salt such as Na, K and Li, - $\text{OPO}_3\text{R}_7\text{R}_8$, or an alkyl sulfonate;

R_2 is an alkyl group or an ammonium salt (NH_4^+); and

R_3 is an alkyl group or a cycloalkyl.

The compounds of formulas I and II as well as analogs thereof, are vascular targeting agents (VTA) useful for the treatment of solid tumor cancers and diseases associated with unregulated neovascularization such as retinal neovascularization and macular, as well as

W/O 8342808

PCT/US2004/017

other conditions of neovascularization. More specifically, the compounds of formula I and II are useful in the treatment of a variety of cancers, including (but not limited to) the following:

- carcinoma, including that of the bladder, breast, colon, kidney, liver, lung, including small cell lung cancer, esophagus, gall bladder, ovary, pancreas, stomach, cervix, thyroid, prostate, and skin, including squamous cell carcinoma;
- hematopoietic tumors of lymphoid lineage, including leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute myeloblastic leukemia, B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, Hodgkins lymphoma, non-Hodgkins lymphoma, hairy cell lymphoma and Burkett's lymphoma;
- hematopoietic tumors of myeloid lineage, including acute and chronic myelogenous leukemia, myelodysplastic syndrome and promyelocytic leukemia;
- tumors of neuroectodermal origin, including fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma;
- tumors of the central and peripheral nervous system, including astrocytoma, neuroblastoma, glioma and schwannoma; and
- other tumors, including melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma, thyroid follicular cancer, anaplastic thyroid cancer and Kaposi's sarcoma.

It is thus an object of the present invention to provide a method to reduce or prevent retinal and corneal neo-vascularization via treatment with a drug that inhibits the assembly of tubulin into microtubules and which are potent vascular targeting agents.

- It is also a further object of this invention is to provide a method to reduce or prevent the development of atherosclerosis or restenosis by treatment with a drug which inhibits the assembly of tubulin into microtubules and which are potent vascular targeting agents.

- The details of one or more embodiments of the invention are set forth in the accompanying description below. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described. Other features, objects, and advantages of the invention will be apparent from the description. In the specification and the appended claims, the singular forms also include the plural unless the context clearly dictates otherwise. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. All patents and publications cited in this specification are incorporated herein by reference.

WO 03/03008

PCT/US2003/00997

DETAILED DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is a comparison of the effects of CA-4P and CA-1P on tumor blood flow over time. The vascular shutdown capacity of each compound was measured in SCID mice implanted subcutaneously with a murine hemangioendothelioma (HMECS-T) tumor (n=3). In each case, 100 mg/kg of drug was injected as a single dose, and fluorescent beads were added through a tail vein 3 minutes prior to sacrifice. Blood flow reduction was quantified by fluorescence microscopy and expressed as a percentage of blood flow observed in these animals treated with a saline control.

Figure 2 is a comparison of the anti-tumor growth activity of CA-1-P and CA-4P versus control in a nude mouse model of human breast carcinoma. Mice (n=3) were treated once daily (3, 6.3, 12.5, or 25mg/kg) in the first five days of the experiment. Some of the tumors were resected for another 3 days beginning on day 42 of the experiment, and

Figure 3 is depiction of the sodium channel activity relationship (SAR) features of the tubulocid VTA pharmacophore. These features are related to the molecular structure of CA-4 and are important for optimal tubulin-binding and vascular shutdown activity.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

As defined herein, the present invention provides compounds of formula I and II and analogs and prodrugs thereof, pharmaceutical compositions employing such compounds and methods of using such compounds.

Listed below are definitions of various terms used to describe the compounds of the instant invention. These definitions apply to the terms as they are used throughout the specification (unless they are otherwise limited in specific instances) either individually or as part of a larger group.

It should be noted that any heteroatom with unsatisfied valence is assumed to have the hydrogen atom to satisfy the valence.

The term alkyl group when used alone or in combination with other groups, are lower alkyl consisting from 1 to 8 carbon atoms and may be straight chained or branched. An alkyl group is an optionally substituted straight, branched or cyclic saturated hydrocarbon group. When substituted, alkyl groups may be substituted with up to four substituent groups, if so defined, at any available point of attachment. Where the alkyl group is said to be substituted with an alkyl group, this is used interchangeably with "branched alkyl group". Exemplary

W3 9369006

PCT/930304991

unsaturated such groups include methyl, ethyl, propyl, isopropyl, n-butyl, t-butyl, isobutyl, pentyl, hexyl, isohexyl, heptyl, 4,4-dimethylpentyl, octyl, 2,2,4-trimethylpentyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, and the like. Exemplary substituents may include but are not limited to one or more of the following groups: halo (such as F, Cl, Br, I), haloalkyl (such as CCl_3 or CF_3), alkoxyl, alkylthio, hydroxyl, carboxyl ($-\text{COOH}$), alkylcarboxyl ($-\text{COOR}$), alkylcarbonyl ($-\text{COR}$), amino ($-\text{NH}_2$), carbamoyl ($-\text{NHCOOH}$ or $-\text{CONH}_2$), urea ($-\text{NHCONH}-$) or thiol ($-\text{SH}$). Alkyl groups as defined may also comprise one or more carbon to carbon double bonds or one or more carbon to carbon triple bonds.

The preferred alkyl groups contain 1-8 carbon atoms; more preferred alkyl groups contain 1-6 carbon atoms. Alkylene as used herein refers to a bridging alkyl group of the formula C_nH_{2n} . Examples include C_2H_4 , $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2$, CH_2CH_2- , and the like.

As used herein the term "cycloalkyl" is a species of alkyl containing from 3 to 15 carbon atoms, without saturating or saturating double bonds between carbon atoms. It may contain from 1 to 4 rings. Exemplary unsaturated such groups include cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, adamantyl, etc. Exemplary substituents include one or more of the following groups: halogen, alkyl, alkoxy, alkyl hydroxy, amino, imino, cyano, thiol and/or alkylthio.

As used herein, the term "aryl" refers to groups with aromaticity, including 5- and 6-membered single-ring aromatic groups that may include from zero to four heteroatoms, as well as multicyclic systems with at least one aromatic ring. Examples of aryl groups include benzene, phenyl, pyrrole, furan, thiophene, thiazole, isothiazole, imidazole, oxazole, isoxazole, pyrazole, oxazole, isoxazole, pyridine, pyrazine, pyridazine, and pyrimidine, and the like.

The aromatic ring can be substituted at one or more ring positions with such substituents as described above, as for example, halogen, hydroxyl, alkyl, etc.

As used herein, the term "lower alkoxy" refers to $-\text{OR}$ alkyl groups, wherein alkyl is as defined hereinabove. The alkoxy group is bonded to the main chain, aryl or heteroaryl group through the oxygen bridge. The alkoxy group may be straight chain or branched; although the straight-chain is preferred. Examples include methoxy, ethoxy, propoxy, butoxy, t-butoxy, i-propoxy, and the like. Preferred alkoxy groups contain 1-4 carbon atoms,

especially preferred alkoxy groups contain 1-3 carbon atoms. The most preferred alkoxy group is methoxy.

W/O #3035008

PCT/US02/34497

As used herein, the term "halogen" or "halo" refers to chlorine, bromine, fluorine or iodine.

As used herein, the term "lower alkylbenzoin" refers to a group wherein one alkyl group is bonded to an amino nitrogen, i.e., $NH(R_1)R_2$. The NH is the bridge connecting the alkyl group to the aryl or heteroaryl. Examples include $NHMe$, $NHEt$, $NHPr$, and the like.

The amino acid acyl group in the amino acid acylamide group is an acyl group derived from the amino acid. The amino acids may be enumerated by α -amino acids, β -amino acids and γ -amino acids. Examples of preferred amino acids include glycine, alanine, leucine, valine, lysine, glutamic acid, aspartic acid, threonine, valine, isoleucine, oxalidine, glutamine, asparagine, tyrosine, phenylalanine, cysteine, methionine, arginine, β -alanine, tryptophan, proline, histidine, etc. The preferred amino acid is aspartic acid.

As used herein, the term "prodrug" refers to a precursor form of the drug which is not sterically converted *in vivo* to produce the active drug. Thus, for example, cembrestatin A-4 phosphate prodrug salts or cembrestatin A-1 phosphate prodrug salts administered to an animal in accordance with the present invention undergo metabolic acid variation and regenerate cembrestatin A-4 or cembrestatin A-1 *in vivo*, e.g., following dissociation and exposure to endogenous non-specific phosphatase in the body. A phosphate prodrug salt or phosphate ester salt moiety as used interchangeably herein, include those with a phosphate ester salt moiety ($-OPO_3(O^-)M^+$) or one phosphate ester moiety ($-OP(O)(OR)_2$) or one phosphate diester moiety ($-OP(O)(OR)_2(O^-)M^+$) where M is a salt and R is chosen to be any appropriate alkyl or branched alkyl substituent (the two R groups may be the same alkyl group or may be mixed), or benzyl, or aryl groups. The salt M is advantageously Na, K and Li, but the invention is not limited in this respect. The phosphate ester salt moiety may also include ($-OP(O)(O^-)alkyl$) or ($-OP(O)(O^-)NH_2$).

As used herein, the term "salt" is a pharmaceutically acceptable salt and one includes acid addition salts including hydrochlorides, hydrobromides, phosphates, sulfates, isophosphates, ethylsulfonates, arylsulfonates, acetates, benzoates, citrates, malates, fumarates, succinates, lactates, and tartrates; alkali metal cations such as Na, K, Li, alkali earth metal salts such as Mg or Ca or organic amine salts such as those disclosed in PCT International Application Nos. WO/00/22626 or WO/00/48666.

All stereoisomers of the compounds of the instant invention are contemplated, either in enantiomeric or in pure or substantially pure form. The definition of the compounds according to the invention embraces all possible stereoisomers and their mixtures. It is very

WO 01/03508

PCT/US00/04497

particularly embraces the racemic forms and the isolated optical isomers having the specified activity. The racemic forms can be resolved by physical methods, such as, for example, fractional crystallization, separation or crystallization of diastereomeric derivatives or separation by chiral column chromatography. The individual optical isomers can be obtained from the racemates by conventional methods, such as, for example, salt formation with an optically active acid followed by crystallization.

The present invention also relates to the administration of a vascular targeting agent, particularly a tubulin binding agent having the chemical structures disclosed herein, for treating malignant or non-malignant vascular proliferative disorders.

Tubulin binding agents inhibit tubulin assembly by binding to tubulin-binding cofactors or cofactor-tubulin complexes in a cell during mitosis and prevent the division and thus proliferation of the cell. Tubulin binding agents comprise a broad class of compounds which inhibit tubulin polymerization, and which generally function as tumor selective vascular targeting agents useful for cancer chemotherapy, as well as for other non-cancer applications such as ocular disease and restenosis.

Vascular Targeting Agents, also known as Vascular Damaging Agents, are a novel class of antineoplastic drugs which attack solid tumors by selectively occluding, disrupting, or destroying the existing vasculature formed by angiogenesis. The cytotoxic mechanism of VTA action is quite divorced from that of anti-angiogenic agents. A single dose of VTA can cause a rapid and irreversible tumor vascular shutdown of existing tumor vasculature, leading eventually to tumor necrosis by induction of hypoxia and nutrient depletion. Other agents have been known to disrupt tumor vasculature but differ in that they also manifest substantial normal tissue toxicity at their maximum tolerated dose. In contrast, genuine VTAs retain their vascular shutdown activity at a fraction of their maximum tolerated dose.

In one embodiment, the present invention is directed to the administration of a vascular targeting agent ("VTA"), particularly a tubulin binding agent, for the treatment of malignant or non-malignant vascular proliferative disorders in ocular tissue.

Neovascularization of ocular tissue is a pathologic condition characterized by vascular proliferation and occurs in a variety of ocular diseases with varying degrees of vision failure. The administration of a VTA for the pharmacological control of the neovascularization associated with non-malignant vascular proliferative disorders such as wet macular degeneration, proliferative diabetic retinopathy or retinopathy of prematurity would potentially benefit patients for which few therapeutic options are available. In another

W/O 8243008

PCT/US04/04497

embodiment, the invention provides the administration of a VTA for the pharmacological control of neovascularization associated with malignant vascular proliferative disorders such as ocular tumors.

- The blood-retinal barrier (BRB) is composed of specialized nonfenestrated tightly-joined endothelial cells that form a transport barrier for certain substances between the retinal capillaries and the retinal tissue. The nascent vessels of the cornea and retina associated with the retinopathies are aberrant, much like the vessels associated with solid tumors. Tubulin binding agents, inhibitors of tubulin polymerization and vascular targeting agents, may be able to attack the aberrant vessels because these vessels do not share architectural similarities with the blood retinal barrier. Tubulin binding agents may halt the progression of the disease much like they do with a tumor-vasculature. Local (non-systemic) delivery of tubulin binding agents to the eye can be achieved using intra-retinal injection, sub-Tenon's injection, ophthalmic drops, xenotransplants, and implants and/or inserts. Systemic administration may be accomplished by administration of the tubulin binding agents into the bloodstream as a solute which is separated by a measurable distance from the diseased or affected organ or tissue, in this case the eye. Preferred modes of systemic administration include parenteral or oral administration.

- The compounds of the present invention may be also contemplated for use in the treatment of vascular disease, particularly atherosclerosis and restenosis. Atherosclerosis is the most common form of vascular disease and leads to insufficient blood supply to critical body organs, resulting in heart attack, stroke, and kidney failure. Additionally, atherosclerosis causes major complications in those suffering from hypertension and diabetes, as well as tobacco smokers. Atherosclerosis is a form of chronic vascular injury in which some of the normal vascular smooth muscle cells ("VSMC") in the artery wall, which ordinarily control vascular tone, regulate blood flow, change their nature and develop "cancer-like" behavior. These VSMC become abnormally proliferative, serving autocrine (growth factors, differentiation enzymes and other proteins) which enable them to invade and spread into the inner vessel lining, blocking blood flow and making that vessel abnormally susceptible to being completely blocked by local blood clotting, resulting in the death of the tissue served by that artery.

Restenosis, the recurrence of stenosis or artery strictures after corrective surgery, is an accelerated form of atherosclerosis. Recent evidence has supported a unifying hypothesis of vascular injury in which coronary artery restenosis along with coronary vein graft and cardiac

WO 93/02598

PCT/US93/0457

allograft atherosclerosis can be considered to represent a much accelerated form of the same pathogenic process that results in spontaneous atherosclerosis (Ip, J. M., *et al.*, (1990) *J Am Coll Cardiol.* 15:1667-1687; Muller, D. W. M., *et al.*, (1992) *J Am Coll Cardiol.* 19:418-432).

Restenosis is due to a complex series of fibroproliferative responses to vascular injury involving potent growth-regulatory molecules, including platelet-derived growth factor (PDGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), also common to the later stages in atherosclerotic lesions, resulting in vascular smooth muscle cell proliferation, migration and neointimal accumulation.

- Restenosis occurs after coronary artery bypass surgery (CAB), endarterectomy, and heart transplantation, and particularly after heart balloon angioplasty, stentectomy, laser ablation or endovascular stenting (in each of which one-third of patients achieving artery-blockage (restenosis) by 6 months), and is responsible for recurrence of symptoms (or death), often requiring repeat revascularization surgery. Despite over a decade of research and significant improvements in the primary success rate of the various medical and surgical treatments of atherosclerotic disease, including angioplasty, bypass grafting and endarterectomy, secondary failure due to late restenosis continues to occur in 30-50% of patients (Rosa, R. (1993) *Nature.* 362:601-609).

The most effective way to prevent this disease is at the cellular level, as opposed to repeated revascularization surgery which can carry a significant risk of complications or death, incurs too much money, and is inconvenient to the patient.

- Microtubules, cellular organelles present in all eukaryotic cells, are required for healthy, normal cellular activities. They are an essential component of the mitotic spindle needed for cell division, and are required for maintaining cell shape and other cellular activities such as motility, anchorage, transport between cellular organelles, neurocellular secretory processes (Dustin, P. (1980) *Sci. Am.*, 243: 66-76), as well as modulating the interactions of growth factors with cell surface receptors, and intracellular signal transduction. Furthermore, microtubules play a critical regulatory role in cell replication as both the c-myc oncogene and CDC-2 kinase, which regulate entry into mitosis, bind to and phosphorylate tubulin (Vardé, F. *et al.* (1990) *Nature.* 343:233-238), and both the product of the tumor suppressor gene, p53, and the T-antigen of SV-40 bind tubulin in a ternary complex (Maxwell, S. A. *et al.* (1991) *Cell Growth Differ.*, 2:115-127). Microtubules are not static, but are in dynamic equilibrium with their soluble protein subunits, α - and β -tubulin heterodimers. Assembly under physiologic conditions requires guanine

WQ 03035048

PCT/US01/0407

triphosphate (GTP) and certain microtubule associated and organizing proteins as cofactors, on the other hand, high calcium and cold temperature cause depolymerization.

Interference with this normal equilibrium between the microtubule and its subunits would therefore be expected to disrupt cell division and motility, as well as other activities dependent on microtubules. This strategy has been used with significant success in the treatment of certain malignancies. Indeed, antimicrotubule agents such as colchicine and the vinca alkaloids are among the most important anticancer drugs. These antimicrotubule agents, which promote microtubule disassembly, play principal roles in the chemotherapy of most curable neoplasms, including acute lymphocytic leukemia, Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphomas, and germ cell tumors, as well as in the palliative treatment of many other cancers.

Taxol® (paclitaxel) has been shown to be an effective antimicrotubule agent. Unlike other antimicrotubules such as colchicine and the vinca alkaloids which promote microtubule disassembly, taxol acts by promoting the formation of unusually stable microtubules, inhibiting the normal dynamic reorganization of the microtubule network required for mitosis and cell proliferation (Schiff, P. B., *et al.* (1979) *Nature* 277: 665; Schiff, P. B., *et al.* (1981) *Biochemistry* 20: 3247). In the presence of taxol, the concentration of tubulin required for polymerization is significantly lowered; microtubule assembly occurs without GTP and at low temperatures, and the microtubules formed are more stable to depolymerization by dilution, calcium, cold, and inhibitory drugs. Taxol will reversibly bind to polymerized tubulin, and other tubulin-binding drugs will still bind to tubulin even in the presence of taxol.

Taxol is, however, highly insoluble and severe allergic reactions have been observed following administration of taxol. Furthermore, cardiac arrhythmias are associated with taxol administration, and like allergic reactions, their incidence is affected by the dosage and rate of taxol administration.

Although others have investigated the use of the antimicrotubule agent colchicine in preventing restenosis, opposite conclusions have been reported (See Carter, *et al.*, "Colchicine Inhibits Restenosis After Ilac Angioplasty In The Atherosclerotic Rabbit" (1989) *Circ.* 80:II-66; O'Keefe, *et al.*, "Ineffectiveness Of Colchicine For The Prevention Of Restenosis After Coronary Angioplasty" (1992) *J. Am. Coll. Cardiol.* 19:1597-1600). The art, however, fails to suggest the use of a vasoconstricting agent such as CA-1 or CA-4 in preventing or reducing restenosis. Thus, the method of the present invention is to prevent or

W/O 63/25968

PCT/US99/34497

reduce the development of subconjunctivitis or melanosis using a vascular targeting agent such as CA-1 or CA-4 or their analogs, as well as prodrugs of these compounds. This microvessel stabilizing mechanism of subconjunctivitis or melanosis prevention is supported by the analogous results in experiments on cellular proliferation and migration using tantalum and H_2O (deuterium oxide), which exert comparable microvessel effects via different underlying mechanisms.

Pharmaceutical compositions of the invention are formulated to be compatible with its intended route of administration. As with the use of other chemotherapeutic drugs, the individual patient will be monitored in a manner deemed appropriate by the treating physician. Dosages can also be reduced if severe neutropenia or severe peripheral neuropathy occurs, or if a grade 2 or higher level of maculitis is observed, using the Common Toxicity Criteria of the National Cancer Institute.

Pharmaceutical compositions for ophthalmic topical administration may include ophthalmic solutions, ophthalmic gels, sprays, ointments, perfusions and inserts. A topically delivered formulation of subunit binding agent should remain stable for a period of time long enough to attain the desired therapeutic effects. In addition the agent must penetrate the surface structures of the eye and accumulate in significant quantities at the site of the disease. Additionally, a topically delivered agent should not cause an excessive amount of local toxicity.

Ophthalmic solutions in the form of eye drops generally consist of aqueous media. In order to accommodate wide range of drugs which have various degrees of polarity, buffers, organic carriers, isotonic carriers, emulsifiers, wetting agents, etc. can be added.

Pharmaceutically acceptable buffers for ophthalmic topical formulations include phosphate, borate, acetate and gluconate buffers, among others. Drug carriers may include water,

water mixtures of lower alcohols, vegetable oils, polyalkylene glycols, perfluorinated base jelly, esters, alcohols, emulsifiers, surfactants, polyvinylpyrrolidone, and isotonicity adjusters. Ophthalmic sprays generally produce the same results as eye drops and can be formulated in a similar manner. Some ophthalmic drugs have poor penetrability across

ocular barriers and are not administrable as drops or sprays. Ointments may then be used to prolong contact time and increase the amount of drug absorbed. Continuous and constant perfusion of the eye with drug solutions can be achieved by placing polyethylene tubing in the conjunctival sac. The flow rate of the perfusate is adjustable via a manual pump system to produce continuous irrigation of the eye. Inserts are similar to soft contact lens positioned on

W/O 8362608

PCT/R80204-497

the cornea, except that inserts are generally placed in the upper cul-de-sac or, less frequently, in the lower conjunctival sac rather than attached to the open cornea. Inserts are generally made of biologically soluble materials which dissolve in lacrimal fluid or disintegrate while releasing the drug.

- 5 The compositions of the present invention may also be formulated for systemic administration. Examples of systemic routes of administration include parenteral, e.g., intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (e.g., inhalation), transcutaneous, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline
- 10 solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerols, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates, and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.
- 15 Parenteral compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremoform EL (BASF, Parsippany, N.J.) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage; and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or
- 20 dispersion medium consisting, for example, of water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various
- 25 antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by
- 30

WU 63623008

PCT/US02/04497

including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (e.g., a vascular targeting agent) in the required amount in an appropriate solvent with or without a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying that yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredients from a previously sterilized solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally and swished and expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or croscarmellose; a lubricant such as magnesium stearate or Stearox; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

Systemic administration can also be by transdermal or transmucosal means. For transdermal or transmucosal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art and include, for example, for transdermal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal

WU 8302008

PCT/US02/04491

aerays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into emulsions, salves, gels, or creams as generally known in the art.

The compounds can also be prepared in the form of suppositories (e.g., with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

The compound of the present invention may also prove useful in the treatment of coronary artery disease by serving as intraluminal agents coated (or conjugated) onto stents to prevent the recurring problem of restenosis after angioplasty.

In addition to the vascular targeting agents described above, the invention also includes the use of pharmaceutical compositions and formulations comprising a vascular targeting agent in association with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient, such as, for example, but not limited to, water, glucose, lactose, hydroxypropyl methylcellulose, as well as other pharmaceutically acceptable carriers, diluents or excipients generally known in the art.

As used herein, terms "pharmacologically effective amount", "pharmacologically effective dosage" or "therapeutically effective amount" mean that amount of a drug or pharmaceutical agent that will elicit the biological or medical response of a tissue, system, animal or human that is being sought by a researcher or clinician.

It is intended that the systemic and neo-systemic administration of VTAs and tubulin binding agents in accordance with the present invention will be formulated for administration in mammals, particularly humans. However, the invention is not limited in this respect and formulations may be prepared according to veterinary guidelines for administration to animals as well.

The vast majority of the compounds described herein can be prepared synthetically through a Wittig reaction between an appropriately substituted aldehyde and an appropriately substituted phosphorous ylide. The aldehydic portion and ylide portion can be readily switched as well as allow for the judicious incorporation of the requisite functional groups within the target stilbenoids (see Scheme 1 and 2 for general synthetic protocols).

PCT/US2002/014972

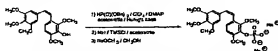


9 The general synthesis approach outlined in Schemes 1 and 2. In each case, the starting materials can either be purchased (Aldrich Chemical Co. and/or Acros (Fisher Scientific), etc.) or prepared in one of two ways by routes described in the literature. It is important to note that each of these preferred outcomes contains the 3,4,5-trimethoxyphenyl moiety in the A-ring of the stilbenoid along with additional functionalization in terms of groups with steric and/or electronic bias at the remaining positions in the B-ring. The preferred stereochemical configuration is *Z*, however it should be readily apparent in anyone skilled in the art that the corresponding *E*-isomers will be readily obtained and certain of these *E*-isomers may have activity as VTAs. In each case, the free phenolic moiety can be readily converted to its corresponding phosphate prodrug entity as exemplified for use of the compounds in Scheme 2.

W/O 0363568

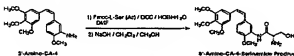
PCT/E8934497

3. Where more than one free phenolic moiety is present, a mixture of partially phosphorylated compounds can be produced by using limiting amounts of the reagents in Scheme 3



Scheme 3: Representative Synthesis of Silbenoid Phosphate Prodrug

A logical developmental extension of the phenolic silbenoid analog is the replacement of the phenol moiety with an amine functionality. This amine can be further modified to form an amide bond to an amino acid residue and function biologically as a prodrug. The parent free amine still functions biologically through a binding interaction with receptors, while the amide prodrug linkage (serinamide, for example) serves as a prodrug construct. This concept has been successfully developed by Ajinomoto Pharmaceuticals Co., Inc. through the preparation of the 3'-amino analog of CA-4 and its corresponding serinamide. Utilizing similar synthetic methodology as employed by Ajinomoto Inc. (Scheme 4), we have prepared a variety of amine functionalized silbenoid compounds and their corresponding serinamide congeners.



Scheme 4: Representative Preparation of Serinamide Prodrug

It is important to note that these compounds can contain both a serinamide and a phosphate salt or ester. In addition, certain of these compounds can contain a phosphate salt judiciously bridged between a phenol and an amine functionality. It is important to note that although serine may be the preferred amino acid to use in these prodrug formulations, other amino acids may be utilized as well. All of these transformations to prodrugs can be

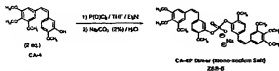
W3 6363508

PCT/US02/1497

achieved by the methods described herein as well as through the use of other standard synthetic methodologies which should be obvious to anyone skilled in the art.

In an effort to improve the bioavailability and pharmacokinetics of stilbenoid derivatives as VTAs, a CA-4P dimer has been prepared (Scheme 5).

5



Scheme 5. Synthesis of CA-4P Dimer

In an analogous manner, a variety of other stilbenoid dimers are anticipated which could be readily prepared by a very similar synthetic strategy to that illustrated in Scheme III. In addition, other salt counter ions such as lithium, potassium, etc. may be employed with presumably equivalent efficacy.

10

The potential biological advantage of the dimers is based on the following strategy:

- A) The dimers may prove to be poorer substrates for enzymatic cleavage by nonspecific alkaline phosphatase or other enzyme.
- B) By slowing down the cleavage of the phosphate (prodrug portion of the molecule), the pharmacokinetics may be altered in a favorable fashion resulting in improved function in terms of vascular targeting.
- C) The dimers are especially attractive due to the fact that enzymatic cleavage delivers two molecules of the biologically potent stilbenoid VTA.

15

A variety of triester and diester phosphates have been prepared in order to address the issue of improved pharmacokinetics leading to enhanced vascular targeting capability.

20

Several phosphate diester CA4 prodrugs have been prepared based on the promising biological activity displayed by the parent phosphate monoester prodrug, CA4P. A general synthesis for these compounds is detailed in Scheme 6. It should be obvious to anyone skilled in the art that an enormous variety of diesters derived from CA4 (and analogously, derived from other phenolic combretastatins as well as diols such as CA1) can readily be prepared using the methodologies described herein.

25

PCT/US2002/014971



22

13



20

WO 03/03698

PCYUS0234487

modifications, both to the materials and methods, may be practiced without departing from the purpose and interest of the invention.

EXAMPLES

Example 1: 2'-Hydroxy-3-bromo-3,4,4',5'-tetraazobenzyl-(2-Ethylhexyl)phosphonium Bromide (GSB-26A)



A. Preparation of 3,4,5-trimethoxybenzyltriphenylphosphonium bromide

To a well-stirred solution of CBr_4 (5.10g, 15.4 mmol) in acetic acid (80mL) at 0°C under N_2 , 3,4,5-trimethoxybenzyl alcohol (2.23g, 11.3 mmol) and triphenylphosphine (4.00g, 15.3 mmol) were added. After 12 hours, the mixture was filtered through Celite and the solvent removed under reduced pressure to yield benzyl bromide as a brown oil. This oil was then dissolved in CH_2Cl_2 (50mL) and PPh_3 (5.23g, 12.4 mmol) was added. The reaction was heated overnight and then ice-cold water was added and the product isolated by extraction with CH_2Cl_2 . The organic phase was washed with brine and dried over sodium sulfate.

Evaporation of the solvent in vacuo resulted in a crude solid, which was recrystallized from ethyl alcohol / hexane to afford 3,4,5-trimethoxybenzyltriphenyl phosphonium bromide (3.0g, 85 %).

B. Preparation of 2-hydroxy-3-bromo-4-methoxybenzaldehyde

Treatment of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (3.04g, 20mmole) with mercuric acetate (1eq, 20mmole) in refluxing ethanol (100mL) containing acetic acid (1% weight percentage) followed by treatment with aq. NaOH gave in 80% yield a mixture of organomercury compounds. The mixture was treated with 1 eq. of Pb(OAc)_2 in CHCl_3 containing a small amount of acetic acid. Purification over silica gel (elution with 30% EtOAc in hexane, afforded 2-hydroxy-3-bromo-4-methoxybenzaldehyde (2.11g, 47.2%).

C. Preparation of 2-(4-butylidimethylallyl)-3-bromo-8-methoxy benzaldehyde

WU 6363008

PCT/JP02/0447

Diisopropylethylamine (3.0 ml) was added to a stirred solution (under argon) of 2-hydroxy-3-bromo-4-methoxybenzaldehyde (1.96, 8.3 mmole) in DMF (15 ml) followed by *t*-butylmethylsilyl chloride (TEBSi, 1.91 g, 12.8 mmole). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min and ice (20 g) was added to the mixture. The mixture was then extracted with ether (3X25 ml). The ethereal solution was washed with water (25 ml) and saturated NaHCO₃ solution (2X15 ml). The solvent evaporated to yield 2-*t*-butylmethylsilyl-3-bromo-4-methoxy benzaldehyde as oil (2.54 g, 7.06 mmole, 83.1%).

D. Preparation of 2'-oxy-4'-isopropylmethyl-3'-bromo-3,4,4',5-tetramethoxy-2'-stilbene

Dry lithium (1.5 ml, 2M Hexane, 3 mmole) was added (under argon) to a suspension of 1,3,4,5-tetraethoxyphenyl-4'-phenylphenylsulfonium bromide (1.57 g, 3 mmole) in THF (50 ml) at -15°C. The resulting deep reddish solution was allowed to stir at room temperature for 30 min. 2-hydroxy-3-bromo-4-methoxybenzaldehyde (0.991 g, 3 mmole) was added, and the reaction mixture was kept stirring for 3 hours. The reaction mixture was diluted with ice-cold H₂O and extracted with ether (3x25 ml). The ethereal solution was washed with water, and solvent was evaporated to yield a Z and E mixture of 2'-oxy-4'-*t*-butylmethylsilyl-3'-bromo-3,4,4',5-tetramethoxystilbene (1.20 g mixture, 2.36 mmole, 78.7%).

H. Preparation of 2'-hydroxy-3'-bromo-3,4,4',5-tetramethoxy-2'-stilbene

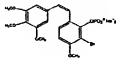
To a DMF (7 ml) solution remaining Z/E mixture of 2'-oxy-4'-*t*-butylmethylsilyl-3'-bromo-3,4,4',5-tetramethoxystilbene (743 mg, 1.66 mmole), KP (84 mg, 1.46 mmole) and HBr (0.17 ml, 1.46 mmole) was added. The reaction was monitored by TLC. Another 0.17 ml of HBr was added in the second day. The reaction was kept stirring for 2 days. Water (15 ml) was added to the solution, and the solution was extracted with ethyl acetate (3x15 ml). The extraction was washed with water, dried with sodium sulfate, and evaporated. The residue was applied to silica gel column and eluted with hexane/ethyl acetate (10) to afford 2'-hydroxy-3'-bromo-3,4,4',5-tetramethoxy-2'-stilbene (236 mg, 0.64 mmole, 43.8%).

¹H-NMR (ppm, δ): 6.99 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.56 (1H, d, J=2.5 Hz), 6.52 (1H, d, J=11.5 Hz), 6.44 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.54 (3H, s)

C-NMR (ppm, δ): 155.00, 153.38, 150.72, 128.40, 126.07, 122.46, 118.50, 110.00, 103.03, 103.49, 60.91, 56.44, 56.15.

WO 03/03509

PCT/US03/0497

Example 3. 2'-O-Bis(benzylphosphoryl)-3-bromo-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-24B)

- 5 A. Preparation of 2'-O-Bis(benzylphosphoryl)-3-bromo-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene
- 2'-hydroxy-3'-bromo-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (250mg, 0.63mmole) was
 10 dissolved in acetonitrile (10ml) in a flask equipped with a septum, thermometer and argon
 inlet. After cooling to -25°C , carbon tetrachloride (Seq. 3.15mmole, 0.6ml) was added and the
 solution was stirred for 5 min. With a syringe, diisopropylstilbene (0.65ml, 2eq.) was
 added followed by DMAI (18mg, 0.3eq, 0.15 mmole). Slow addition of dibenzyl
 15 phosphine (0.25ml, 1.26 mmole, 2.0eq.) was begun 1 min later at such a rate the reaction
 temperatures remained below -20°C . After completion of the reaction in 1 hour by TLC
 analysis, 0.5M $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ was added (5ml), and the solution was allowed to warm to room
 temperature and extracted with ethyl acetate (3x20ml). The combined solvent extracts were
 washed with water (25ml) and saturated NaCl (25ml), then dried. Filtration and removal of
 20 solvents gave an oil that was chromatographed on a column of silica gel (hexane/ethyl acetate,
 4:1) to give 2'-O-Bis(benzylphosphoryl)-3-bromo-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (700mg,
 94.3%) as a clear gum.

25 B. Preparation of 2'-Dibenzylphosphite-3'-bromo-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene

- Chlorotriethylsilane (70mg, 0.648mmole, 0.082ml, 2eq.) was slowly added (with
 vigorous stirring) to a solution of 2'-O-Bis(benzylphosphoryl)-3-bromo-3,4,4',5-
 30 tetramethoxy-(Z)-stilbene (212mg, 0.324mmole) and sodium iodide (97.3mg, 0.648mmole)
 in dry acetonitrile (5 ml, in a dry flask under argon). After stirring 30 min, TLC analysis
 showed no starting material. Enough water was added to dissolve the salt and a straw color
 was removed by the addition of 10% aq. sodium bisulfite (3 drops). The solvent was
 separated and the aqueous phase extracted with ethyl acetate (4x10ml). The combined

PCT/US02/04497

10

Oc1cc(O)c(C=Cc2cc(OC)c(OC)c(OC)c2)cc1OC

4-methoxy-2,3-dinitrobenzaldehyde (2.94 mmol) and 3,4,5-

20

29

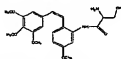
WU 636350H

PCT/US2003/07



- A well-stirred solution of 2',3'-Dinitro-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (0.422 g, 1.08 mmol) in a mixture of acetone-water (2:1) was heated to 50°C. Then sodium thiomisolate (1.88 g, 10.81 mmol, 10.0 equiv) was added and the reaction mixture was heated to reflux for 6 hours. The reaction was cooled to room temperature and water was added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (4x25 mL). The combined organic layer were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated in vacuo. The mixture was then subjected to preparative TLC to give the 2',3'-Dinitro-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene.
- $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.61 (d, s), 8.3.60 (dH, s), 8.3.82 (3H, s), 8.6.38 (1H, d, $J=8.64$ Hz), 8.6.48 (1H, d, $J=12.12$ Hz), 8.6.49 (2H, s), 8.6.52 (1H, d, $J=12.06$ Hz), 8.6.66 Hz (1H, d, $J=8.43$ Hz).

Example 5: 2'-serinamide-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (25B-49)



- A. Preparation of 2'-Fmoc-L-serinamide-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene
- To a well stirred solution of 2'-nitro-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (0.114g, 0.362 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) were added DCC (0.101 g, 0.489 mmol), Fmoc(Ar)-L-serinamide (0.173 g, 0.467 mmol), and HOBT-H₂O (0.0702 g, 0.730 mmol) at room temperature. After 21.5 h, EtOAc was added and the mixture was filtered. The filtrate was washed 5 times with water and twice with brine and the organic phase was dried over sodium sulfate. After evaporation of the solvent the yellow oil was purified by normal-phase preparative TLC (60% hex-EtOAc) developing twice to afford 2'-Fmoc-L-serinamide-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (0.1308 g, 54% yield). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ 8.13

WQ 630309

PCT/US2004/097

(br, 1H), 3.91 (s, 1H), 7.77 (d, 2H, $J=7$ Hz), 7.57 (br, 2H), 7.40 (br, 2H), 7.31 (br, 2H), 7.13 (d, 1H, $J=8.5$), 6.70 (dd, 1H, $J=8.5$, 2.4 Hz), 6.32 (br, 2H), 6.22 (s, 2H), 5.27 (m, 1H), 4.54 (m, 2H), 4.40 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.48 (s, 6H), 1.95 (s, 3H).

5

B. Preparation of 2'-serinamide-3,4,4',5-tetraacetoxy-(2)-stilbene

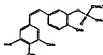
2'-PhOC-L-serinamide-3,4,4',5-tetraacetoxy-(2)-stilbene (0.131 g, 0.226 mmol) was dissolved in 1.5 mL of dichloromethane and 1.5 mL of MeOH and 0.22 mL (0.0176 g,

0.44 mmol) of an aqueous solution of 2N- sodium hydroxide were added. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h dichloromethane was added and the organic phase was washed once with water and twice with brine, dried under sodium sulfate and the solvent evaporated. The resulting oil was purified by normal phase preparative TLC (65% CH_2Cl_2 - MeOH) to afford 2'-serinamide-3,4,4',5-tetraacetoxy-(2)-stilbene (52.9 mg, 67%).
 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9.03 (s, 1H), 8.02 (d, 1H, $J=2.6$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J=8.5$ Hz), 6.68 (dd, 1H, $J=8.5$, 2.6 Hz), 6.60 (d, 1H, $J=12.1$ Hz), 6.49 (d, 1H, $J=12$ Hz), 3.81 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.77 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.60 (s, 6H), 3.36 (t, 1H, $J=5.3$ Hz), 1.80 (br, 2H).
 $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 171.8, 159.5, 152.8, 137.7, 135.8, 132.6, 131.8, 130.1, 124.3, 119.9, 110.9, 109.8, 105.2, 65.1, 60.9, 56.5, 55.9, 55.5.

15

Example 6. CA-4P Methyl Ester, Ammonium Salt (Tm-com-299)

20



Step A

0.60 mL (2.69 mmol) of 2-cyanoethyl diisopropylphosphoramidate, 0.90 mL (3.2 mmol) dry Hunig's base and 0.14 mL (3.66 mmol) anhydrous methanol (Aldrich) were mixed in 15 mL dry THF under argon with stirring. The reaction was allowed to proceed for over 20 hours and monitored by TLC (a white-orange spot on staining with anhydrous silica follows the solvent front for a 50:50 mix of ethyl acetate-hexanes, or has an $R_f = 0.12$ in 5%

W/O 02/02/008

PCT/05/03487

ethyl acetate in hexanes). After this about 2.5g of silica gel that had previously been neutralized with triethylamine was then added to the acetone mixture and the solid products were adsorbed onto the silica gel by removing the solvents by rotavaporization. The dried down silica gel was collected into a Biotage FLASH sample injection (SID4) cartridge and eluted through a silica gel packed FLASH 205 column with 7% ethyl acetate in hexanes on a Biotage FLASH 40 chromatography system, pressure = 15 psi. (Note: Before sample elution the column was prepared by neutralizing the silica gel in it with approximately 250 ml of a 15% triethylamine-methanol solution after which it was rinsed with about 100 ml of the 7% ethyl acetate in hexanes solution). Fractions 6 to 10 were pooled and rotavaporated to give 0.377 g (1.60 mmol) of product in 60% yield (to the initial chlorophosphoramide).

Step B

0.3531 g (1.529 mmol) of product from Step 1 was added to 4.0 ml (1.8 mmol) of a 0.45 M 1H-tetrazole solution in acetonitrile (Pitka) in a stoppered round-bottom flask under argon. Next, 3.7 ml (0.1515 g/ml = 0.56 g, 1.70 mmol) of a Combesastate A4 (CA4) solution in dry methylene chloride was added slowly from a syringe dropwise to this solution under argon with stirring. The reaction was again monitored by TLC using a 50:50 ethyl acetate-hexanes mixture. Rf of product = 0.70 (visible by uv, turns brown by air oxidation of CA4 group and also develops orange with ninhydrin) and allowed to react for about 33 hours.

Step C

After this 0.449 g of (~ 2 mmol) m-chloroperoxybenzoic acid (70-75%, Acros) was added to the reaction mixture and product formation was monitored by TLC as before. Almost complete conversion to the oxidized ester was evident in 10 minutes, but the reaction was run for 2 hours. TLC monitoring of the products showed a broad spot with an Rf of about 0.36 in 50:50 ethyl acetate-hexanes. The product was purified by flash column chromatography to give 0.250 g (0.540 mmol, 35% yield) of product shown pure by 1-H and 31-P NMR.

Step D

0.2122 g (0.4598 mmol) of pure product from Step 3 was dissolved in 10 ml of an 80:20 methanol-methylene chloride solution to which was added 0.15 ml (1.14 mmol, ~2.5 equivalents) concentrated ammonia solution (28-30% ammonia, Acros) which was allowed to react for over 24 hours. The 3-sinpropylpropionitrile by-product, ammonia and solvents were

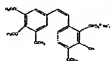
W/O 43035068

PCT/ES03/0497

removed by reevaporation and then vacuum pump. This gave the excess product in about 90% yield verified by ^1H and ^{31}P NMR and greater than 90% in purity by HPLC and capillary gel electrophoresis.

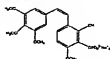
- Using the procedures described herein or by modification of the procedures described herein as known to one of ordinary skill in the art, the following additional compounds have been prepared:

1'-Dihydroxy-3'-Hydroxy-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-1A)



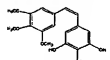
10

1'-Hydroxy-3'-Dihydroxy-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-2A)



15

3',5'-Dihydroxy-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-1B)



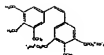
20

(0.27g, 89%). ^1H NMR (300MHz): 3.67(dH, s), 3.79(dH, s), 3.86(dH, s), 4.96(dH, t), 5.23(tH, d, s), 12.28(tH, s), 6.35(tH, d, s), 6.43(tH, s), 6.56(dH, s). ^{13}C NMR (75.47 MHz): 55.92, 60.94, 61.14, 106.2, 108.68, 129.19, 130.07, 132.29, 133.69, 134.02, 137.27, 148.02, 152.83.

25

3',5'-Tetramethoxy-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-2B)

PCITR501/24497



3



19

15



20

23

W/O #2423568

PCT/US2004/091



- (3.49g, 4.3mmol, 82.7%) $^1\text{H-NMR}$ (ppm, δ , CDCl_3): 7.27 (1H, d, $J=12.3\text{Hz}$), 7.08 (1H, d, $J=8.3\text{Hz}$), 7.03 (1H, d, $J=13.5\text{Hz}$), 6.75 (2H, s), 6.55 (1H, d, $J=8.6\text{Hz}$), 3.97 (6H, s), 3.90 (6H, s), 3.88 (3H, s), $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm, δ , CDCl_3): 153.70, 152.05, 147.73, 137.83, 135.86, 134.36, 128.09, 123.12, 122.15, 118.11, 104.43, 103.66, 61.30, 56.50, 56.27.

7'-Ethoxycarbonyl-3,3',4,4',5'-pentamethoxy-2'-nitrobenzoic acid (ZSB-19)

10



- (77mg, 0.21mmol, 43%, solid) $^1\text{H-NMR}$ (ppm, δ , DMSO): 7.25 (1H, d, $J=12.3\text{Hz}$), 7.08 (1H, d, $J=8.3\text{Hz}$), 6.93 (1H, d, $J=13.5\text{Hz}$), 6.82 (1H, d, $J=8.6\text{Hz}$), 6.71 (2H, s), $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm, δ , DMSO): 2.07.

3'-hydroxy-3,4,4',5'-pentamethoxy-2'-nitrobenzoic acid (ZSB-20)

20



- (360mg, 1.62mmol, 62.5%) $^1\text{H-NMR}$ (ppm, δ , CDCl_3): 6.80 (2H, s), 6.80 (1H, s), 6.72 (2H, s), 6.63 (1H, s), 3.92 (1H, s), 3.86 (3H, s), $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm, δ , CDCl_3): 153.79, 152.84, 149.83, 135.70, 133.83, 133.37, 128.70, 128.30, 106.47, 103.84, 102.86, 61.40, 60.83, 56.52, 56.27.

23

3'-Hydroxy-2'-nitro-3,4,4',5'-pentamethoxy-2'-nitrobenzoic acid (ZSB-77A)

WU 8362508H

PCT/JP03/04477



(251.5 mg, 0.726 mmol, 72.6%) ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.79 (d, J=8.7 Hz, 1H), 6.58 (d, J=12.3 Hz, 1H), 6.52-6.44 (m, 4H), 5.89 (s, 1H), 3.83, 3.79 (m, 9H), 3.63 (s, 9H); CDCl₃: δ 153.1, 147.5, 145.8, 138.9, 137.4, 133.0, 130.6, 125.4, 124.2, 120.0, 118.6, 106.8, 106.4, 61.3, 61.2, 56.7, 56.6, 56.2.

3'-Disodium Phosphate-3',4',5'-pentamethoxy-4,4'-stilbene (ZSB-27B)



(117.8 mg, 0.23 mmol, 73.7%, solid) ¹H-NMR (CDCl₃, D₂O): δ 6.70 (d, J=8.4 Hz, 1H), 6.55 (d, J=12.1 Hz, 1H), 5.52 (s, 1H), 3.70, 3.56, 3.48 (m, 4H), 1.94 (s, 1H); ¹³C-NMR (200 MHz, D₂O): δ 151.2, 151.3, 150.0, 137.1, 136.9, 136.0, 134.0, 126.5, 124.2, 124.1, 108.3, 106.7, 61.2, 61.1, 56.2, 56.1. ³¹P-NMR (300 MHz, D₂O): δ 1.43

4'-hydroxy-3'-iodo-3,4,5,5'-tetramethoxy-4,4'-stilbene (ZSB-29A)

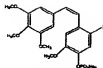


(0.72 g, 1.5 mmol, 88%, oil) ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.67 (s, 1H), 7.73 (s, 6H), 3.84 (s, 3H), 6.09 (s, 1H), 6.29 (d, J = 12.1, 1H), 6.47 (d, J = 12.7, 1H), 6.53 (s, 2H), 6.74 (d, J = 1.6, 1H), 7.20 (d, J = 1.6, 1H).

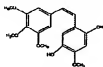
4'-Disodium Phosphate-3'-iodo-3,4,5,5'-tetramethoxy-4,4'-stilbene (ZSB-29B)

WU 61630008

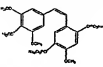
PCT/US2004/07



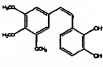
2',5'-Dihydroxy-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-33A)



2',5'-Tetraethoxy-Diphosphate-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-33B)



2',5'-Dihydroxy-3,4,5-trimethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-34A)

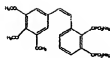


(15p, 1.65mmol, 45.3%) ¹H-NMR (CDCl₃, 300MHz): δ 3.63 (9H, s, 3×OCH₃), 3.19 (1H, s, O16), 5.50 (1H, s, O15), 6.47 (CH₂=CH-2,3,4,5), 6.53 (1H, s, CH=C1), 6.60 (1H, s, CH=C1), 6.92 (1H, s, H-4', 3'-5'-2'-6').

2',5'-Diphosphate-3,4,5-trimethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-34B)

WO 03/035068

PC7R/56394497



(0.030g, 0.071mmol, 59.1%, solid) $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, D_2O): δ 3.69 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.77 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.66 (dH, a, H-2, H-6), 6.73 (t (H, d, J=12.02Hz, CH=CH-), 6.86 (t (H, d, J=12.21Hz, CH=CH-), 6.98 (dH, m, H-5, H-6'), 7.24 (dH, m, m - OCH_3), 7.36 (t (H, d, J=7.14Hz, H-4')) $^{\text{PH-NMR}}$ (300MHz, D_2O) δ -3.27, 3.88.

3',4'-Dihydroxy-3,4,5-trimethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-37A)



3',4'-Dihydroxy-3,4,5-trimethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-37B)



$^1\text{H-NMR}$ (ppm, δ , D_2O): 6.77 (t (H, s); 6.73 (dH, q); 6.52 (dH, s); 6.46 (t (H, d, J=12.1Hz), 6.41 (t (H, d, J=12.1, 11D), 3.88 (3H, s), 3.72 (6H, s). $^{\text{PH-NMR}}$ (ppm, δ , D_2O): -3.66.

4'-hydroxy-3,4,5-trimethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-46A)

WO 2002/0008

PCT/US2004/07



5 (ZSR-40B) 4'-phosphate-3,4,5-trimethoxy-(Z)-stilbene



(55 mg, 0.20 mmol, 10.0%) ¹H-NMR (ppm, δ): 7.13 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.00 (1H, d, J = 8.3 Hz), 6.59 (2H, s), 6.36 (1H, d, J = 13.0 Hz), 6.45 (1H, d, J = 12.1 Hz), 3.67 (3H, s),
 10 ¹³C-NMR (ppm, δ): 153.00, 153.50, 130.00, 129.80, 129.76, 125.00, 120.00, 119.50, 108.00, 106.44, 61.00, 56.00. P-NMR (ppm, δ): 0.10.

15 2'-Fluoro-3'-Hydroxy-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSR-41A)

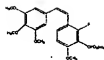


(126 mg, 0.37 mmol, 74.8%) ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.79 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.57-
 6.50 (m, 1H), 3.96 (s, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.80 (s, 6H). ¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃):
 20 δ 153.2, 150.6, 147.6, 147.4, 137.6, 136.4, 136.2, 135.4, 131.6, 122.35, 122.29, 120.27, 111.9,
 25 25, 119.08, 106.3, 61.29, 56.78, 56.25

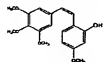
25 (ZSR-41B) 2'-Fluoro-3'-Diodium Phosphate-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene

WO 03/05008

PCT/US03/0497

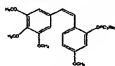


3 2'-Hydroxy-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-46A)



(520mg, 15%, solid), ^{13}C NMR (ppm, δ , CDCl_3): 7.43 (1H, s=8.6Hz), 7.20 (1H, d, J=16.3Hz), 6.94 (1H, d, J=16.3Hz), 6.74 (2H, s), 6.55 (1H, s, J=8.3Hz), 3.94 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.81 (3H, s).

10 2'-Disodium Phosphate-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-46B)



15 ^1H NMR (ppm, δ , D_2O): 7.49 (1H, d), 7.36 (1H, d), 6.94 (4H, m), 6.57 (1H, d), 3.77 (6H, s), 3.71 (3H, s), 3.63 (3H, s). ^{31}P NMR (ppm, δ , D_2O): 1.26.

20

25 3,5-Dinitro-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-13)

WQ #9025068

PCT/US02/34497

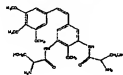


3',Δ'-Diamino-3,4,4',5'-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-14)



¹H NMR (CDCl₃, 360 MHz) δ 6.56 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, J=12.2 Hz), 6.34 (d, 1H, J=12.2 Hz), 6.14 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.70 (s, 6H).

3',Δ'-Dicarboximide-3,4,4',5'-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-15)



2'-Nitro-3'-hydroxy-3,4,4',5'-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-26A)

WU 63425008

PCT/C50794/07



(80 mg, 0.23 mmole, 65%, solid) ^1H NMR: 3.64 (s, 6H, 2 x OCH_3), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 6.10 (s, 2H, aryl), 6.59 (d, $J = 12$, 1H), 6.68 (d, $J = 12$, 1H), 6.78 (d, $J = 8.4$, 1H), 6.92 (d, $J = 8.4$, 1H).

1'-Nitro-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-39A)



(5.29 g, 21% yield) ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) 87.59 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz), 7.24 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.01 (dd, 1H, $J = 8.7$, 2.7 Hz), 6.80 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz), 6.63 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz), 6.78 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.62 (s, 6H).

1'-Azido-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-39B)

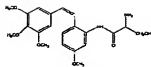


(0.817 g, 38%) ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) 87.09 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz), 6.91 (d, 1H, $J = 11.6$ Hz), 6.42 (d, 1H, $J = 12$ Hz), 6.20 (dd, 1H, $J = 8.4$, 2.5 Hz), 6.25 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.64 (s, 6H), 1.50 (br, 1H).

1'-Serlamide-3,4,4',5-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-45)

WU 03635008

PCT/US2002/01



(0.417 g, 50%). ¹H NMR (CDCl₃, 360 MHz) δ: 8.22 (d, 1H, *J*=6.4 Hz), 6.51 (t, 2H), 6.49 (d, 1H, *J*=1.6 Hz), 6.47 (d, 1H, *J*=12 Hz), 6.30 (dd, 1H, *J*=8.4, 2.5 Hz), 6.25 (d, 1H, *J*=2.4 Hz), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.64 (s, 6H), 1.55 (br, 1H).

3'-Hydroxy, 5'-Nitro-3,4,4',5'-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-43)



¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 3.72 (t, 4H), 3.83 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 6.42 (d, 1H, *J*=12.1 Hz), 6.47 (s, 2H), 6.61 (d, 1H, *J*=12.1), 7.16 (d, 1H, *J*=2.0 Hz), 7.39 (d, 1H, *J*=2.0 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 56.04, 61.00, 62.54, 106.06, 117.26, 120.73, 126.81, 131.34, 132.38, 133.92, 137.92, 139.80, 142.64, 150.12, 153.18.

3'-Hydroxy, 5'-Amino-3,4,4',5'-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-44)



(60 mg, 15%, oil). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 3.71 (t, 4H), 3.78 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 6.27 (d, 1H, *J*=1.0), 6.35 (d, 1H, *J*=1.0), 6.41 (d, 2H, *J*=1.0), 6.54 (s, 2H).

23

3'-Amino-3'-hydroxy-3,4,4',5'-tetramethoxy-(Z)-stilbene (ZSB-48)

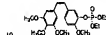
WO 03/028408

PCT/US03/04497



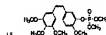
(90.5 mg, 0.276 mmol) ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): 3.64 (s, 6H, s, 3H), 3.84 (s, 3H), 6.32 (d, 1H, J=8.4), 6.45 (d, 1H, J=2.1), 6.51 (d, 1H, J=12.8), 6.51 (s, 2H), 6.68 (d, 1H, J=8.4). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 55.7, 56.1, 60.8, 101.1, 105.9, 117.6, 120.1, 125.7, 130.9, 132.1, 132.2, 132.6, 137.3, 145.7, 152.7.

CA 41' Diethyl Ester (Oxi-com 187) -



10

CA 4P Dimethyl Ester (Oxi-com 184)



15

CA 4P Cyclohexane Ester, Ammonium Salt (Oxi-com 191)



20

CA 4P 4-Chlorobenzoyl Ester, Ammonium Salt (Oxi-com-192)



25

W/O 6363300H

PCT/US2003/077

CA4P *o*-Ortyl Ester, Ammonium Salt (Ox-com 210)

5 CA4P Trifluoroethoxy Ester, Ammonium Salt (Ox-com 211)

**Example 7: Biological Activity**

- The pharmacological properties of the compounds of this invention may be confirmed by a number of pharmacological assays. The exemplified pharmacological assays have been carried out with several of the compounds of the present invention.

A. MTT Cytotoxicity Assay

- Exponentially growing were treated with the following compounds for 1 hour and 5 days. Insoluble compounds were formulated in a small amount (0.3%) of DMSO for biological evaluation. Cell viability was determined by the colorimetric MTT assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide according to well-established procedures (see Barltrop, et al. (1996) for a general protocol of this type of assay). The results are shown in Table 2.

Table 2.

Compound	IC50 @ 1h (nM)	IC50 @ 5 days (nM)
Z5B-2B	25	1
Z5B-3B	2.4	0.0063
Z5B-36	2	0.0067
Z5B-2AA	3.07	0.016

WU 01615001

PC3/US0204497

ZSR-27	16	0.016
ZSR-36	2	0.008
ZSR-41A	8	0.015
ZSR-43	8	1.3
ZSR-45	10	0.05
ZSR-46A	43	0.068
Osi-com153	8	0.26
Osi-com191	35	0.13
Osi-com209	58	0.07
Osi-com210	25	0.07

B. Vascular Shutdown Assay

- The vascular effects of the following compounds were assessed in tumor-bearing mice using a fluorescein-bead assay. A MHEC-5Y human glioblastoma tumor model was established by subcutaneous injection of 0.5×10^6 cultured MHEC-5Y cells into the right flank of Fox Chase CD-17 SCID mice and allowed to grow to a size of 200mm³ before i.p. injection with a single dose of saline control or compound. At 24 hours post-injection, mice were i.v. injected with 0.25ml of diluted FluoSphere beads (1:6 in physiological saline) in the tail vein, and sacrificed after 3 minutes. Tumor cryosections to a thickness of 10 μ m were directly examined using quantitative fluorescent microscopy. For quantification, image analysis of 3 sections from three tumor treated in each group were examined and vascular shutdown was expressed as vessel area per tissue area (mm²) in percentage of the control. The results are shown in Table 3.

15

Table 3.

Compound	% Blood Flow Shutdown (100mg/kg)
ZSR-36	55
ZSR-21	44
ZSR-71B	41
ZSR-29B	43

W/O 938398

PCT/US02/34497

Z5B-118	51
Z5B-398	50
Z5B-45	43
Chl-con192	50
Chl-con210	89

OTHER EMBODIMENTS

It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims.

It is also to be understood that the drawings are not necessarily drawn to scale, but that they are merely conceptual in nature.

The following references are incorporated herein by reference in their entirety:

- Aleksandrak, K., et al., (1998), "Antitumor Activity of Diaryl Compounds with Structural Features Resembling Combretastatin A-4," *Anti-Cancer Drugs* 9: 543-550.
- Bedford, S. B., et al., (1996), "Synthesis of Water-Soluble Prodrugs of the Cytosolic Agent Combretastatin A-4," *Inorganic and Medicinal Chemistry Letters* 6(7): 157-160.
- Berridge, M. V., et al., (1996), "The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays: the use of Tetrazolium salts" *Biochemistry* 4: 15-19.
- Brown, M. L., et al., (2000), "Comparative Molecular Field Analysis of Colchicine: Inhibition and Tubulin Polymerization for Combretastatin Binding to the Colchicine Binding Site on Beta Tubulin," *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 8: 1433-1441.
- Chen, Z., et al., (2000), "Preparation of New Anti-Tubulin Ligands through a Diels-Alder, Addition-Elimination Reaction to a Bromo-Substituted CD Unsubstituted Sulfonide," *Journal of Organic Chemistry* 65(23): 8411-8415.
- Cushman, M., et al., (1992), "Synthesis and Evaluation of Analogues of (2S)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)butane as Potential Cytotoxic and Antimitotic Agents," *Journal of Medicinal Chemistry* 35(12): 2293-2306.
- Duck, et al., (1997), "Combretastatin A4, an Agent that Displays Potent and Selective Toxicity toward Tumor Vasculature," *Anticancer Research* 17: 1829-1834.

WO 03/26008

PCT/US02/0497

- del Rey, B., *et al.*, (1999). "Leishmanicidal Activity of Combretastatin Analogues and Heteroanalogues." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9: 2711-2714.
- Deshpande, V. R., *et al.*, (1992). "Synthesis of Combretastatin D-2." *Tetrahedron Letters* 33(29): 4213-4216.
- El-Zayen, A. A. E., *et al.*, (1993). "In vitro Evaluation of the Anticarcinogenic Activity of Combretastatin A-4, a natural product from *Combretum caffer*." *Anticancer Drugs* 4: 19-25.
- Gallmah, S. M., *et al.*, (2001). "Effects of Combretastatin A4 Phosphate on Endothelial Cell Morphology in Vitro and Relationship to Tumor Vascular Targeting Activity in Vivo." *Anticancer Research* 21: 93-102.
- Griggs, J., *et al.*, (2001). "Protein Anti-Metastatic Activity of Combretastatin A4." *International Journal of Oncology* 19: 821-825.
- Gwaltney, S. L., *et al.*, (2000). "Novel Sulfonate Analogues of Combretastatin A-4: Potent Antimetastatic Agents." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 11: 871-874.
- Hataoka, T., *et al.*, (1998). "Novel B-ring Modified Combretastatin Analogues: Synthesis and Anticarcinogenic Activity." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 8: 3371-3374.
- Horii, K., *et al.*, (2001). "Stoppage of Blood Flow in 3-methylcholanthrene-induced Autochthonous Primary Tumor due to a Novel Combretastatin A-4 derivative, AC7700, and its Antitumor Effect." *Medical Science Monitor* 7(2): 26-33.
- Horii, K., *et al.*, (1999). "Antitumor Effects due to Irreversible Stoppage of Tumor Tissue Blood Flow: Evaluation of a Novel Combretastatin A-4 Derivative, AC7700." *Ann. J. Cancer Research* 96: 1026-1038.
- Iyer, S., *et al.*, (1996). "Induction of Apoptosis in Proliferating Human Endothelial Cells by the Tumor Specific Antiangiogenesis Agent Combretastatin A-4." *Cancer Research* 56: 4510-4514.
- Kanayoshi, H., *et al.*, (1995). "Antitumor Effects due to Irreversible Stoppage of Irradiation of a Novel Combretastatin A-4 Derivatives, AC7700." *Int. J. Cancer Research* 96: 1026-1039.
- Maya, A. B. S., *et al.*, (2000). "Design, Synthesis, and Cytotoxic Activities of Naphthyl Analogues of Combretastatin A-4." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 10: 2549-2551.
- McGown A.T., *et al.*, (1989). "Structural and Biochemical Comparisons of the Anti-mitotic Agents Colchicine, Combretastatin A-4 and Amiphenanthole." *Anti-cancer Drug Design* 3: 249-254.
- McGown A.T., *et al.*, (1990). "Differential Cytotoxicity of Combretastatins A1 and A4 in Two Daunorubicin-Resistant P388 Cell Lines." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 26: 79-81.

WQ 0503064

PC/PC89/04497

- McLodde, M., et al., (1998), "Synthesis and Antitumor Activity of Combretastatin Analogs: Heterocombretastatin." *Eur J Med Chem* 33: 71-77.
- Medarde, M., et al., (1999), "Synthesis and Pharmacological Activity of Diarylindole Derivatives. Cytotoxic Agents Based on Combretastatin." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9: 2303.
- Medarde, M., et al., (1993), "Synthesis and Pharmacological Activity of Combretastatin Analogues, Naphthylcombretastatin and Related Compounds." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 3(3): 229-232.
- Nilbel, V., et al., (1999), "A Novel Combretastatin A-4 Derivative AC 7700, Shows Marked Antitumor Activity against Advanced Solid Tumors and Orthotopically Transplant Tumors." *Int. J. Cancer Research* 96: 1016-1023.
- Ohsumi, K., et al., (1999), "Synthesis and Antitumor Activity of Cis Restricted Combretastatin: 5 Membered Heterocyclic Analogues." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9: 3133-3138.
- Pedley, R. B., et al., (2001), "Eradication of Colorectal Xenografts by Combined Combretastatin A-4 3-O- Phosphate." *Cancer Research* 61: 4710-4722.
- Petit, George R., Combretastatin A-4 Pending Anti-Tumor Chemotherapy, US Patent No. 5,361,121.
- Petit, George R., Cell Growth Inhibitory Macrocyclic Lactones Desaturated Combretastatin D-1 and D-2 US Patent No. 4,840,736.
- Petit, George R., Sheo B. Singh, Combretastatin A-4 - Tubulin Polymerization Inhibitor; Antitumor Agent, US Patent No. 4,996,237.
- Petit, G. R., et al., (1999), "Antitumor Agents. 410. Asymmetric Hydroxylation of trans-Combretastatin A-4." *Journal of Medicinal Chemistry* 42: 1439-1445.
- Petit, G. R., et al., (1993), "Antitumor Agents. 379. Synthesis of Phenanthrin Phosphate." *Journal of Medicinal Chemistry* 41: 1688-1695.
- Petit, G. R., et al., (1995), "Antitumor Agents 322. Synthesis of combretastatin A-4 prodrugs." *Anti-cancer Drug Design* 10: 299-309.
- Petit, G. R., et al., (1982), "Isolation and Structure of Combretastatin." *Canadian Journal of Chemistry* 60: 1374-1376.
- Petit, G. R., and John W. Lippert (2000), "Antitumor Agents 429. Syntheses of the Combretastatin A-1 and Combretastatin B-1 prodrug." *Anti-cancer Drug Design* 15: 203-216.
- Petit, G. R., Sheo Bax Singh (1987), "Isolation, Structure, and Synthesis of Combretastatin A-2, A-3, and B-2." *Canadian Journal of Chemistry* 65: 2090.

W0 93/08008

PCT/US93/04497

- Planey, K. G., et al. (2000). "Synthesis and Biological Evaluation of Aryl Azide Derivatives of Colchicine A-4 as Molecular Probes for Tubulin." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 8: 2417-2423.
- 5 Rey, B. d., et al. (1999). "Leishmanicidal Activity of Combretastatin Analogues and Heterocoumarins." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9: 2711-2714.
- Kimble, G., et al. (1995). "Inhibition of [H] Microtubule Binding to Tubulin by Structurally Diverse Microtubule Inhibitors which Interact at the Colchicine Binding Site." *Biochemistry and Molecular Biology International* 35(6): 1153-1159.
- 10 Sackin, D. L. (1993). "Podophyllotoxin, Segasine and Combretastatin: Natural Products that Bind at the Colchicine Site of Tubulin." *Phytochemistry* 59: 163-228.
- 15 Schwikard, S., et al. (2000). "Bioactive Compounds from *Combretum erythrorhizon*." *Journal of Natural Products* 63: 437-460.
- Sello, G., et al. (1996). "Using a Canonical Matching to Measure the Similarity Between Molecules: The Taxol and the Combretastatin A1 Case." *Advances in Molecular Similarity* 1(243-266).
- 20 Shirai, R., et al. (1998). "Asymmetric Synthesis of Antimitotic Combretastatinoids with Potent Antitumor Activity Against Multidrug Resistant Cells." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 8: 1997-2000.
- 25 Shirai, R., et al. (1997). "Synthesis of Conformationally Restricted Combretastatins." *Heterocycles* 46: 145-148.
- 30 Springer Matthew L., et al. (2000). "Angiogenesis monitored by perfusion with a space-filling microbead suspension." *Molecular Therapy* 1: 82-87.
- Tan, L. P., et al. (1975). "Effects of Indole Alkaloids and Related Compounds on the Properties of Brain Microtubular Protein." *Biochem. Soc. Trans.* 3(1): 121-124.
- 35 Toner, O. M., et al. (2001). "Mechanism Associated with Tumor Vascular Shut Down Induced by Combretastatin A-4 Phosphate: Intravital Microscopy and Measurement of Vascular Permeability." *Cancer Research* 61: 6413-6422.
- 40 Wata, M. E., et al. (1997). "Effects of Novel and Conventional Anti-Cancer Agents on Human Endothelial Permeability: Influence of Tumor Secreted Factors." *Anticancer Research* 17: 71-76.
- 45 Zhao, S., et al. (1996). "Positron Emission Tomography of Murine Liver Metastases and the Effects of Treatment by Combretastatin A-4." *Eur. J Nucl Med* 26: 231-238.

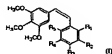
W/O 81433508

PCT/US2004/07

CLAIMS

What is claimed is:

1. A compound of the formula:



wherein:

- 10 R_1 , R_2 and R_3 is independently H, OH, lower alkoxy, NH_2 , NO_2 , N_3 , $\text{N}(\text{H})\text{R}_m$, halogen, a phosphine ester salt moiety of the general formula $(-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-\text{M}^+))_n$, wherein M is a metal cation or salt such as Na, K and Li, or - OPO_3R_4 ;
- R_1 is H, OH, lower alkoxy, NH_2 , NO_2 , $\text{N}(\text{H})\text{R}_m$ or phosphine ester salt moiety of the general formula $(-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-\text{M}^+))_n$, wherein M is a metal cation or salt such as Na, K and Li, or - OPO_3R_4 , wherein NH_2 or OH may cyclize with R_4 ;
- 13 R_2 is H, lower alkoxy, or phosphine ester salt moiety of the general formula $(-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-\text{M}^+))_n$, wherein M is a metal cation or salt such as Na, K and Li or - OPO_3R_4 ;
- R_4 is an amino acid acylamino group; and
- 20 R_3 and R_4 is independently lower alkyl, cycloalkyl, aryl or an ammonium salt (NH_4^+).
2. The compound of claim 1, wherein:
- R_1 , R_2 and R_3 is independently H, OH or NHR_4 ;
- R_2 is H, an amino acid acylamino group, or a phosphine ester salt moiety of the general formula $(-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-\text{M}^+))_n$, wherein M is a metal cation or salt such as Na, K and Li; or has the formula - OPO_3R_4 ;
- 23 R_3 is lower alkoxy; and
- R_4 is an amino acid acylamino group.

WO 03/025008

PCT/US03/06497

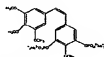
3. The compound of claims 1 or 2, wherein said amino acid acylamino group is
serineamide.
4. A method for inhibiting tubulin polymerization by contacting a tubulin-containing
5 system with an effective amount of the compound of claim 1.
5. The method of claim 4, wherein said system is a tumor cell.
6. A method of treating a host afflicted with a neoplastic disease by administering to said
10 host an effective amount of the compound of claim 1.
7. The method of claim 4, wherein said contacted system is located in a patient.
8. The method of claim 7, wherein said patient is a mammal.
- 15 9. A method for treating cancer by administering the compound of claim 1, wherein said
cancer to be treated includes leukemia, lung, colon, thyroid, CNS, melanoma, ovarian,
renal, prostate, and breast cancers.
- 20 10. A pharmaceutical composition comprising the compound of claim 1 as active
component and a pharmaceutically acceptable carrier.
11. A method for selectively targeting and destroying tumor vasculature by administering
is a patient in need thereof, an effective amount of the pharmaceutical composition of
25 claim 10.
12. A method for selectively reducing the flow of blood to a tumor by administering
to a patient in need thereof, an effective amount of the pharmaceutical composition of
claim 10.
- 30 13. A method for treating macular degeneration, diabetic retinopathy, and retinal diseases
of the eye where vascularization is involved by administering to a patient in need
thereof, an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 10.

W/O 4363008

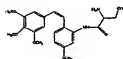
PCT/C50294497

14. A method for treating osteoarthritis by administering to a patient in need thereof, an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 10.

- 5 15. A compound of the formula:

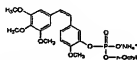


16. A compound of the formula:



10

17. A compound of the formula:

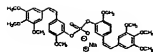


18. A compound of the formula:

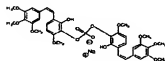
15

WU 5365508

PCT/0204497

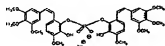


19. A compound of the formula:



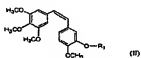
3

20. A compound of the formula:



10

21. A compound of the formula:



(II)

wherein:

- 15 R_1 is a phosphate ester salt moiety of the general formula $C-O-P(O)(O M^+)_2$, wherein M is a metal cation or salt such as Na , K and Li , $-OPO_3R_2$, or an alkyl sulfonate;
 R_2 is an alkyl group or an ammonium salt (NH_4^+); and
 R_3 is an alkyl group, an aryl group or a cycloalkyl.

WO 41/63500

PCT/US02/04497

22. The compound of claim 21, wherein
R₁ is a phosphate ester salt moiety of the general formula -PO₃H₂R₂;
R₂ is an ammonium salt (NH₄⁺); and
5 R₃ is alkyl group.
23. A method for inhibiting tubulin polymerization by contacting a tubulin-containing system with an effective amount of a compound of claim 21.
- 10 24. The method of claim 23, wherein said system is a tumor cell.
25. A method of treating a host afflicted with a neoplastic disease by administering to said host a compound of claim 22.
- 15 26. The method of claim 22, wherein said contract system is located in a patient.
27. The method of claim 26, wherein said patient is a mammal.
28. A method for treating cancer by administering to a patient in need thereof, a
20 compound of claim 21, wherein said cancer to be treated includes leukemia, lung, colon, thyroid, CNS, melanoma, ovarian, renal, prostate, and breast cancers.
29. A pharmaceutical composition comprising a compound 21 as active component and a pharmacologically acceptable carrier.
- 25 30. A method for selectively targeting and destroying tumor vasculature by administering to a patient in need thereof, an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 29.
- 30 31. A method for selectively reducing the flow of blood to a tumor by administering to a patient in need thereof, an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 29.

W/O 43633008

PCT/US02/4497

32. A method for treating muscular degeneration, diabetic retinopathy, and related diseases of the eye where vascularization is involved by administering to a patient in need thereof, an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 29.
- 5 33. A method for treating osteoarthritis by administering to a patient in need thereof, an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 29.

W/O 4.350548

1/2

PCT/US2003/01497

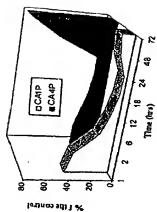


Figure 1.

WQ=3405000

2/3

PCB50502407

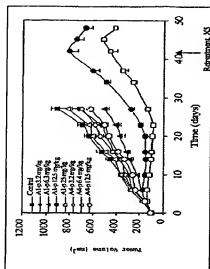


Figure 2.

W0 95/23508

3/3

PCT/US95/23497

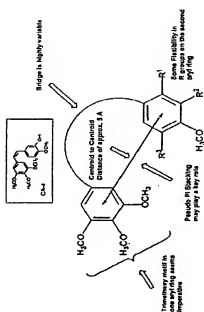


Figure 3. Salient SAR Features of Sulfonamide VTAs

WFO 03/035008 A3

(19) World Intellectual Property Organization
International Domain



INTRODUCTION

(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/035008 A3

- [illegible]

(22) Date of publication of the International sample report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Code and Abbreviations" appearing in the beginning of each regular issue of the *PLT* library.

[illegible]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

670555

Continuation of S. FIELDS SEARCHED from 3:
 HIGGINS, CARLOS, 80013
 SEARCH WORDS: silicon, silicon, polymer, bubble, universal, tumor, cancer, pharmaceutical, machinery

Form PCT/ISA/230 (patent sheet) July 1990)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 9/00	A 6 1 K 31/661	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 K 31/6615	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 C 205/37	A 6 1 P 35/02	
C 0 7 C 207/04	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
C 0 7 C 217/84	C 0 7 C 205/37	
C 0 7 C 237/04	C 0 7 C 207/04	
C 0 7 F 9/09	C 0 7 C 217/84	
	C 0 7 C 237/04	A
	C 0 7 F 9/09	K

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),QA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TO),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MC,MK,MN,MW,MX,MZ,N,O,NZ,QM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 チャップリン, デービッド ジェイ.

イギリス国 オーエックス9 5 エスエックス オックスフォードシャイアー. ワットリントン, アストン ロウونت, プロウデン パーク 14

(72)発明者 ガーナー, チャールズ マンリー ザ サード

アメリカ合衆国 テキサス 76712, ワコ, チェリー クリーク ドライブ 1657

(72)発明者 ケーン, ロバート ロナルド

アメリカ合衆国 テキサス 76708, ワコ, オールド スティンベック ロード 2401

(72)発明者 ビニー, ケビン ジー.

アメリカ合衆国 テキサス 02114, ウッドウェイ, トベカ ドライブ 717

(72)発明者 プレジオン, ジョセフ アンソニー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02114, ボストン, ワン ロングフェロー プレイス, スイート 3120

(72)発明者 エドワードセン, クラウス

デンマーク国 ディーケー-2930 クランベンボーグ, クランベンボーグベジュ 26

F ターム (参考) 4C086 AA01 AA02 DA34 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA36 ZB26 ZB27

ZC01

4C206 AA01 AA02 GA18 JA06 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA36 ZB26

ZB27 ZC01

4H006 AA01 AA03 AB28 BJ50 BN10 BP30 BU32 BV25 GP03 GP12

GP22

4H050 AA01 AA03 AB28